



ASSOCIAZIONE
ITALIANA
DI COLTURE
CELLULARI

PHOENIX - ONLUS



Stem Cell Foundation
for Human Life

E-mail: info@stemphoenix.org

Web Site: www.stemphoenix.org



**ORDINE PROVINCIALE
DEI MEDICI-CHIRURGI
E DEGLI ODONTOIATRI
DI FIRENZE**

Via G.C. Vanini, 15 - 50129 Firenze
Tel. 055 496 522 - Fax 055 481 045



Convegno Annuale della Associazione Italiana di Colture Cellulari

LA MORTE DELLA CELLULA: implicazioni fisio-patologiche e terapeutiche

Firenze, 2-4 dicembre 2009



Sotto il patrocinio di:
Phoenix Onlus Stem Cell Foundation for Human Life
Università degli Studi di Firenze
Ordine dei Medici della Provincia di Firenze

Sede del Convegno:
Ex Scuola di Sanità Militare di Firenze
Via Venezia, 5 - Firenze



Website: <http://www.unifi.it/plrna>

ORGANIZZATORI



Presidente:

Sergio Capaccioli

Co-Presidente:

Rosanna Supino

Comitato organizzatori:

Antonio Conti

Federico Di Gesualdo

Monica Monici

Comitato Scientifico:

Giuseppe Arancia

Franco Bambi

Susanna Benvenuti

Sergio Capaccioli

Michele Caraglia

Elisabetta Cerbai

Sonia Emanuele

Carlo Leonetti

Matteo Lulli

Augusto Pessina

Paola Romagnani

Katia Scotlandi

Rosanna Supino

Roberta Tiozzo

Ewa Janina Witort

Sandra Zecchi

SEGRETERIA SCIENTIFICA (per invio abstracts): sergio@unifi.it

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA (per iscrizione al convegno e pagamento quote): aicc.onlus@gmail.com

**Locandina e Brochure a cura di Federico di Gesualdo, Matteo Lulli e
Phoenix Scientific Staff**

BENVENUTO



*Cari amici e colleghi,
anche a nome del suo Consiglio Direttivo sono lieto di invitarvi al Convegno Annuale dell'Associazione Italiana Colture Cellulari (AICC), che si terrà a Firenze dal 2 al 4 dicembre.*

L'argomento centrale di quest'anno sarà la morte cellulare nei suoi molteplici aspetti e ruoli fisiologici e patologici, spesso considerati antitetici quali sono l'apoptosi e la necrosi. Emergerà però come apoptosi e necrosi rappresentino in realtà i due estremi di un continuum di forme intermedie di morte il cui paradigma di maggior rilievo è l'aponecrosi.

Di particolare interesse per la salute dell'uomo è il fatto che le alterazioni dei meccanismi che regolano l'apoptosi rivestono un ruolo spesso fondamentale nella patogenesi di larga parte delle più gravi patologie dell'uomo. Da ciò emerge l'ampia gamma di bersagli terapeutici che l'apoptosi può offrire e quindi l'esplosione d'interesse che ha suscitato e sta suscitando nei clinici e nell'industria farmaceutica.

Di pari interesse, l'applicazione terapeutica di cellule staminali nelle patologie in cui un eccesso di apoptosi ha distrutto un certo tessuto o organo: questo nuovo approccio terapeutico, noto come medicina rigenerativa, rappresenta uno degli strumenti più promettenti che siano emersi negli ultimi anni per la cura delle più svariate e gravi malattie dell'uomo ma che può sottendere anche importanti rischi collaterali, che solo uno studio estremamente rigoroso può escludere.

Non a caso il congresso è sotto il patrocinio di Phoenix Stem Cell Foundation for Human Life, una fondazione assai recente che, avendo come presupposto la salvaguardia dei principi etici, si propone come scopi fondamentali la promozione della ricerca traslazionale nel campo delle cellule staminali e il trasferimento dei suoi risultati alle cliniche nella prospettiva di un loro impatto sulla salute dell'uomo (website www.stemphoenix.org).

Accanto ad alcuni paradigmi di patologie che sottendono eccessi o difetti di apoptosi, il convegno AICC di quest'anno si propone di passare in rassegna alcuni dei principali interventi terapeutici molecolari e cellulari che esistono nel settore. Su questa base ci auguriamo che il convegno sia anche occasione d'incontro e confronto fra discipline diverse che possono sinergizzare in modo ottimale nella ricerca biomedica traslazionale.

Sergio Capaccioli e Rosanna Supino

INFORMAZIONI



QUOTE DI PARTECIPAZIONE

Soci AICC	€ 100,00
Non Soci AICC	€ 150,00 (€ 100,00 + € 50,00 quota associativa)
Dottorandi	€ 100,00 (€ 100,00 + € 50,00 quota associativa) *
Studenti	€ 40,00 *

*Occorre presentare certificazione.

Per l'iscrizione alla AICC è necessario compilare e trasmettere il file scaricabile dal sito.

Le quote comprendono la partecipazione ai lavori, il pranzo e i coffee break.

MODALITA' DI PAGAMENTO

Bonifico Bancario intestato ad ONLUS-AICC c/c n.31552 c/o Banca Popolare di Verona Banco S. Geminiano e S. Prospero, Agenzia H, via Vignolese 530, 41100 MODENA –
IBAN: IT15H0518812909000000031552

Assegno Bancario intestato ad ONLUS-AICC e spedito al Tesoriere AICC –
Dr.ssa Roberta Tiozzo, Dip. Scienze Biomediche, Univ. Modena e Reggio Emilia
via Campi 287 - 41100 MODENA

HOTEL CONVENZIONATI

Hotel Tornabuoni Beacci
Via de' Tornabuoni, 3 Rosso
50123 Firenze, Italia
Tel. +39 055 294283
info@tornabuonihotels.com
<http://www.tornabuonihotels.com/>

Hotel Boccaccio
Via della Scala, 59
50123 Firenze, Italia
Tel. +39 055 282776 - Fax +39 055 268183
info@boccacciohotel.com
<http://www.boccacciohotel.com/it>

Hotel La Residenza
Via de' Tornabuoni, 8
50123 Firenze, Italia
Tel. +39 055 218684 - Fax +39 055 284197
info@laresidenzahotel.com
<http://www.laresidenzahotel.com/it>

PREMI



L'AICC BANDISCE I SEGUENTI PREMI

PREMI ONLUS-AICC 2009 "Senior"

riservati a ricercatori (con laurea vecchio ordinamento o laurea specialistica) che non abbiano compiuto 40 anni di età al 10 ottobre 2009

1° PREMIO di € 5.000,00

2° PREMIO di € 3.000,00

PREMI ONLUS-AICC 2009 "Junior"

riservati a ricercatori (con laurea vecchio ordinamento o laurea specialistica) che non abbiano compiuto 30 anni di età al 10 ottobre 2009

1° PREMIO di € 3.000,00

2° PREMIO di € 1.500,00

PREMI ONLUS-AICC 2009 "POSTER"

assegnati alle due migliori comunicazioni presentate sotto forma di poster da ricercatori che non abbiano compiuto 35 anni di età al 10 ottobre 2009

2 PREMI di € 1.000,00 ciascuno

Su richiesta, i PDF dei poster potranno essere pubblicati on-line sul web-site del convegno

PROGRAMMA

Mercoledì 2 Dicembre



SESSIONE 1

APOPTOSI, AUTOFAGIA E NECROSI: FISILOGIA E PATOLOGIA

Moderatori: Giuseppe Arancia – Piero Dolara

12.00 - 13.30

Registrazione

13.30 - 14.00

Apertura dei lavori - Saluto delle Autorità

14.00 - 14.20

O1 - Il mantenimento della omeostasi tissutale: ruolo della morte cellulare

Angelo Manfredi (*Università Vita-Salute San Raffaele, Milano*)

14.20 - 14.40

O2 - Apoptosi, necrosi e aponecrosi quante facce per una medaglia?

Sandra Zecchi (*Università degli Studi di Firenze*)

14.40 - 15.00

O3 - Ruolo del campo morfogenetico nei fenomeni apoptotici durante l'embriogenesi

Mariano Bizzarri (*Università La Sapienza, Roma*)

15.00 - 15.20

O4 - La morte cellulare attraverso una autofagia non-canonica

Francesca Scarlatti (*Università degli Studi di Torino*)

15.20 - 15.40

O5 - Apoptosi e anoikis

Rosanna Supino (*Istituto Nazionale dei Tumori, IRCCS, Milano*)

15.40 - 16.00

Coffee break

PROGRAMMA

Mercoledì 2 Dicembre



SESSIONE 1

APOPTOSI , AUTOFAGIA E NECROSI : FISILOGIA E PATOLOGIA

Moderatori: Giuseppe Arancia – Piero Dolara

16.00 – 16.20

O6 - Apoptosis in microgravity

Monica Monici (*ASA/Università degli Studi di Firenze*)

16.20 – 16.40

O7 - Apoptosi e radiazioni

Aldo Becciolini (*Università degli Studi di Firenze*)

16.40 – 17.00

O8 - Apoptosi e campi elettromagnetici

Lina Ghibelli (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*)

17.00 – 17.20

DISCUSSIONE

17.20 - 18.20

COMUNICAZIONI LIBERE

17.20 – 17.30

O9 - Apoptosis induced by sphaerophorin and pannarin, lichen metabolites, on human melanoma

Silvia Caggia (*Università di Catania*)

17.30 – 17.40

O10 - Biotossine algali con distinti meccanismi molecolari d'azione inducono morte cellulare con processi convergenti su modifiche dei pattern di fosforilazione nel sistema hsp 27

Gian Luca Sala (*Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia*)

PROGRAMMA

Mercoledì 2 Dicembre



SESSIONE 1

APOPTOSI , AUTOFAGIA E NECROSI : FISILOGIA E PATOLOGIA

Moderatori: Giuseppe Arancia – Piero Dolara

17.40 – 17.50

O11 - Il contributo dell'autofagia nell'apoptosi indotta da cisplatino in cellule di melanoma: sinergia o protezione?

Barbara Del Bello (*Università degli Studi di Siena*)

17.50 – 18.00

O12 - Il ruolo dell'autofagia apoptosi-indipendente in cellule di osteosarcoma umano farmacoresistenti

Stefania Meschini (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*)

18.00 – 18.10

O13 - Ruolo dell'apparato del Golgi nell'apoptosi indotta da doxorubicina liposomiale non pegilata in cellule di carcinoma della prostata ormono-refrattario

Francesco Fabbri (*Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori, Meldola, Ravenna*)

18.10 – 18.20

O14 - Il reclutamento dell'antigene CD99 induce apoptosi nelle cellule di sarcoma di Ewing attraverso l'attivazione di p53

Clara Guerzoni (*Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna*)

18.20 – 18.30

O15 - Identification and characterization of a novel Ikaros splice variant and its involvement in apoptosis

Daria Capece (*Università degli Studi de L'Aquila*)

PROGRAMMA

Giovedì 3 Dicembre



SESSIONE 2

PATOLOGIE DA DIFETTO O ECCESSO DI APOPTOSI

Moderatori: Giuseppe Carella - Katia Scotlandi

09.00 - 09.20

O16 - Apoptosi e autofagia nelle malattie neurodegenerative
Gianluigi Forloni (*Istituto Mario Negri, Milano*)

09.20 - 09.40

O17 - Ruolo del TGF-beta nella differenziazione e nella suscettibilità all'apoptosi delle cellule T helper 17 (Th17) umane
Francesco Annunziato (*Università degli Studi di Firenze*)

09.40 - 10.00

O18 - Apoptosi e tumori
Giorgio Parmiani (*Università-Ospedale San Raffaele, Milano*)

10.00 - 10.20

O19 - Apoptosi nel diabete
Davide Lauro (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*)

10.20 - 10.40

Coffee break

10.40 - 11.00

O20 - Apoptosi nelle patologie oftalmologiche
Carlo Nucci (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*)

11.00 - 11.20

O21 - Apoptosi, atrofia muscolare e cachessia
Paola Costelli (*Università degli Studi di Torino*)

11.20 - 11.40

O22 - Apoptosi e virus
Antonio Mastino (*Università degli studi di Messina*)

11.40 - 12.00

DISCUSSIONE

PROGRAMMA

Giovedì 3 Dicembre



SESSIONE 3

MODULATORI DELL'APOPTOSI COME STRUMENTO TERAPEUTICO

Moderatori: Lucio Luzzatto - Michele Caraglia

12.00 – 12.30

COMUNICAZIONI LIBERE

12.00 – 12.10

O23 - AMPK inhibition induces apoptosis in pediatric b-all cells with mll gene rearrangements

Benedetta Accordi (*Università degli Studi di Padova, Istituto Superiore di Sanità e George Mason University, VA, USA*)

12.10 – 12.20

O24 - Ruolo delle cellule Natural Killer (NK) nella fisiopatologia dell'infezione da HIV-1

Domenico Mavilio (*IRCCS, Istituto Clinico Humanitas di Milano*)

12.20 – 12.30

O25 - Stress in Apoptosis induced by Lipoic Acid - Role of Endoplasmic Reticulum (ER)

Tania Camboni (*Università degli Studi di Cagliari*)

12.30 – 12.45

Nuove tecnologie nello studio della vitalità cellulare

Amr Abid (*Life Technologies*)

12.45 - 14.00

PRANZO E VISIONE DEI POSTER

PROGRAMMA

Giovedì 3 Dicembre



SESSIONE 3

MODULATORI DELL'APOPTOSI COME STRUMENTO TERAPEUTICO

Moderatori: Lucio Luzzatto - Michele Caraglia

14.00 – 14.20

O26 - Induzione di apoptosi nella chemioterapia dei tumori
Donatella Del Bufalo (*Istituto Regina Elena, IRCCS, Roma*)

14.20 – 14.40

O27 - Invecchiamento, senescenza e apoptosi nella terapia
antiangiogenica
Adriana Albini (*Gruppo Multimedica, IRCCS, Milano*)

14.40 - 15.00

O28 - Apoptosi e Survival in Oncologia
Angelo Nicolin (*Università degli Studi di Milano*)

15.00 – 15.20

O29 - Strategie farmacologiche per il superamento della
chemioresistenza tumorale
Enrico Mini (*Università degli Studi di Firenze*)

15.20 – 15.40

O30 - CA IX inhibitors in cancer
Claudiu Supuran (*Università del Studi di Firenze*)

15.40 – 16.00

Coffee break

16.00 – 16.20

O31 - Apoptosi o autofagia nella regressione dei tumori Stromali
Gastrointestinali trattati con Imatinib?
Tiziana Negri (*Istituto Nazionale dei Tumori, IRCCS, Milano*)

PROGRAMMA

Giovedì 3 Dicembre



SESSIONE 3

MODULATORI DELL'APOPTOSI COME STRUMENTO TERAPEUTICO

Moderatori: Lucio Luzzatto - Michele Caraglia

16.20 – 16.40

O32 - Le proprietà oncosoppressive intrinseche dell'oncogene MET come strumento di morte apoptotica di cellule tumorali

Maria Flavia Di Renzo (*Università di Torino - IRCCS, Candiolo, Torino*)

16.40 – 17.00

DISCUSSIONE

17.00– 17.30

COMUNICAZIONI LIBERE

17.00 – 17.10

O33 - Il Partenolide sensibilizza le cellule di epatocarcinoma all'apoptosi indotta da TRAIL

Daniela Carlisi (*Università degli Studi di Palermo*)

17.10 – 17.20

O34 - In vitro and in vivo functional characterization of new cycle-peptides inhibitors for C-X-C chemokine receptor-4 (CXCR4)

Luigi Portella (*Istituto Nazionale Tumori Fondazione G. Pascale, Napoli e CNR Napoli*)

17.20 – 17.30

O35 - Nanoparticelle di ZnO inducono stress ossidativo e apoptosi in cellule di carcinoma del colon (LoVo)

Maria Condello (*Istituto Superiore di Sanità, Roma*)

PROGRAMMA

Giovedì 3 Dicembre



SESSIONE 3

MODULATORI DELL' APOPTOSI COME STRUMENTO TERAPEUTICO

17.30 – 17.50
CERIMONIA DI CONSEGNA DEI PREMI AICC
RELAZIONI DEI VINCITORI

17.50– 18.40
LETTURA MAGISTRALE
O36 - I determinanti dell'apoptosi come bersaglio terapeutico
Gerry Melino (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*)

18.40 – 19.00
ASSEMBLEA SOCI AICC

20.30
Cena Sociale (*Harry's Bar*)

PROGRAMMA

Venerdì 4 Dicembre



SESSIONE 4

MEDICINA RIGENERATIVA NELLE PATOLOGIE DA ECCESSO DI APOPTOSI

Moderatori: Augusto Pessina - Umberto Altamura

08.30 – 08.50

O37 - Ingegneria dei tessuti: una nuova prospettiva per la riparazione degli organi?

Paolo Di Nardo (*Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"*)

08.50 - 09.10

O38 - Biomateriali in medicina rigenerativa: influenza sulla apoptosi

Rolando Barbucci (*Università degli Studi di Siena*)

09.10 - 09.30

O39 - Analisi dei rischi nel percorso di sviluppo in GMP dei prodotti di terapia cellulare

Franco Bambi (*Università degli Studi di Firenze*)

09.30 – 09.50

O40 - Cellule staminali endogene ed esogene per contrastare la morte cellulare nelle distrofie muscolari

Maurilio Sampaolesi (*Università degli Studi di Pavia*)

09.50 – 10.10

O41 - Le cellule staminali embrionali come modello per lo studio della differenziazione cardiomiocitaria

Elisabetta Cerbai (*Università degli Studi di Firenze*)

10.10 – 10.30

O42 - Le cellule staminali mesenchimali nelle malattie autoimmuni

Benedetta Mazzanti (*Università degli Studi di Firenze*)

10.30 – 10.50

DISCUSSIONE

PROGRAMMA

Venerdì 4 Dicembre



SESSIONE 4

MEDICINA RIGENERATIVA NELLE PATOLOGIE DA ECCESSO DI APOPTOSI

Moderatori: Augusto Pessina - Umberto Altamura

10.50 – 11.10

Coffee break

11.10 – 11.50

COMUNICAZIONI LIBERE

11.10 – 11.20

O43 - Sphingosine 1-phosphate induces differentiation of mesoangioblasts towards smooth muscle cells

Chiara Donati (*Università degli Studi di Firenze*)

11.20 – 11.30

O44 - The rexinoid 6-OH-11-O-hydroxyphenantrene induces apoptosis of human osteosarcoma and mesenchymal stem cells

Barbara Dozza (*Università degli Studi di Bologna e Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna*)

11.30 – 11.40

O45 - Rigenerazione del tessuto osseo nella pseudoartrosi congenita della tibia mediante l'impiego di cellule stromali midollari autologhe: studio pre-clinico

Valentina Devescovi (*Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna*)

11.40 – 11.50

O46 - Degenerazione del disco intervertebrale: studio degli aspetti istologici e molecolari per una terapia rigenerativa

Elisa Leonardi (*Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna e Phoenix ONLUS Stem Cell Foundation for Human Life, Firenze*)

PROGRAMMA

Venerdì 4 Dicembre



SESSIONE 4

MEDICINA RIGENERATIVA NELLE PATOLOGIE DA ECESSO DI APOPTOSI

11.50 – 12.30

**PREMIAZIONE DEI MIGLIORI POSTER E CERIMONIA DI
CHIUSURA**

12.45 - 13.45

PRANZO DI CHIUSURA DEL CONVEGNO

14.00 - 15.00

VISITA ALLA BASILICA DI SAN LORENZO
(Dr.ssa Costanza Capaccioli, Storica dell'Arte)

COMUNICAZIONI ORALI



O1 IL MANTENIMENTO DELLA OMEOSTASI TISSUTALE: RUOLO DELLA MORTE CELLULARE

Manfredi A.

Università Vita-Salute San Raffaele e Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Il danno a livello dei tessuti viventi è caratterizzato dalla produzione di segnali infiammatori a carattere omeostatico. I segnali omeostatici di necrosi, chiamati anche *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) o allarmine, attraggono e attivano in sede leucociti infiammatori e promuovono la migrazione e la divisione cellulare in modo da rimpiazzare le cellule danneggiate. Dati recenti indicano nelle cellule dell'immunità innata, in particolare nei macrofagi, le prime responsabili nell'integrare i segnali di necrosi in modo da stimolare la funzione dei progenitori e delle cellule staminali richiamati o attivati localmente. I segnali di necrosi attivano inoltre fagociti in grado di presentare l'antigene, quali le cellule dendritiche (DC), in prospettiva del rischio di infezione da parte di microorganismi presenti nell'ambiente. Le DC attivate vanno incontro a un processo di differenziazione, definito come "maturazione", che le mette in grado di lasciare i tessuti periferici e raggiungere i linfonodi drenanti. I segnali di necrosi influenzano profondamente le caratteristiche delle DC in periferia: a seconda del codice che le DC ricevono in sede di danno, divengono in grado di causare nei linfonodi l'amplificazione di cloni di linfociti la cui funzione può andare dalla protezione verso patogeni, alla tolleranza, all'infiammazione e autoimmunità cornica, alla riparazione delle ferite. E' interessante notare come cellule dell'immunità acquisita (un'aggiunta relativamente recente dal punto di vista filogenetico) abbiano sviluppato la capacità di rilasciare dopo attivazione segnali di necrosi nel microambiente, ricreando così un ambiente "necrotico". Questo meccanismo consente di mantenere nel tempo lo stato attivato e influenza la resistenza all'apoptosi e la funzione dei linfociti attivati. Nel complesso i nostri dati indicano come segnali di necrosi giochino un ruolo chiave nell'omeostasi dell'organismo, consentendo la rigenerazione dei tessuti e la protezione dagli agenti patogeni in condizioni di danno a organi e tessuti.

Bianchi ME, Manfredi AA. Immunology. Dangers in and out. *Science*. 2009; 323(5922):1683-4; High-mobility group box 1(HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2007;220:35-46.

O2 APOPTOSI, NECROSI E APONECROSI QUANTE FACCE PER UNA MEDAGLIA?

Zecchi Orlandini S.

Dipartimento di Anatomia, Istologia, Medicina Legale – Università di Firenze

The term "aponecrosis" was firstly introduced about ten years ago by our two laboratories (Zecchi-Orlandini/Capaccioli) to indicate a type of cell death, sharing common features with apoptosis and necrosis, which depends on the energy availability of the cell as well as on the expression of typical proto-oncogenes.

Ten years later, what is left about this assumption?

This presentation attempts to delineate the state of the art regarding some aspects in theme of cell death.

O3 RUOLO DEL CAMPO MORFOGENETICO NEI FENOMENI APOPTOTICI DURANTE L'EMBRIOGENESI

Bizzarri M.

Università La Sapienza, Roma

O4 LA MORTE CELLULARE ATTRAVERSO UNA AUTOFAGIA NON-CANONICA

Scarlatti F.

Laboratorio di Endocrinologia Cellulare and Molecolare, Divisione di Endocrinologia e Metabolismo, Dipartimento di Medicina Interna. Università di Torino, Italia

La macroautofagia (qui di seguito chiamata autofagia) è un dinamico ed evolutivamente conservato processo utilizzato per sequestrare il citoplasma di interi organelli in vescicole dotate di doppia membrana, e definite autofagosomi, che fondendosi con il lisosoma degradano il carico autofagico. Recentemente, in cellule tumorali, abbiamo dimostrato l'esistenza di due forme distinte di autofagia: autofagia canonica e autofagia non-canonica. Diversamente dall'autofagia classica o canonica, l'autofagia non-canonica è un processo che per formare l'autofagosoma non richiede l'intero macchinario di proteine coinvolte nell'autofagia (Atg) e in particolare la Beclina 1. Pertanto, l'autofagia non-canonica non è invalidata né dal knock-down della Beclina 1 né dal suo partner di legame, la proteina hVps34. Inoltre, l'overespressione della proteina Bcl-2, che blocca l'autofagia canonica indotta dalla privazione di siero, legandosi alla Beclina 1, non contrasta l'autofagia non-canonica indotta dal resveratrolo (un polifenolo naturale) nelle MCF-7. Le MCF-7, una linea cellulare del carcinoma mammario umano, sprovviste dell'attività della caspasi-3, sono refrattarie alla morte cellulare apoptotica in seguito al trattamento con il resveratrolo. Di conseguenza, almeno nelle MCF-7, l'autofagia non-canonica è coinvolta nella morte cellulare caspasi-indipendente indotta dal resveratrolo.

Ringraziamenti: Patrice Codogno dell'INSERM U756, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11, 92296 Châtenay-Malabry, Francia e Riccardo Ghidoni, Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare del Dipart.di Medicina, Ospedale San Paolo, Università di Milano, Italia.

COMUNICAZIONI ORALI



O5 ANOIKIS: UN TIPO DI MORTE CELLULARE INDOTTA DA UN INIBITORE DELLA V-H-ATPASE IN LINEE DI CARCINOMA DEL COLON

Supino R.

*Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, via Venezian 1,
20133 Milano, Italia*

Le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice sono implicate non solo nella trasformazione maligna, ma anche nei processi invasivi e metastatici e nella morte cellulare in quanto alla base di una apoptosi anoikis-mediata. La loro modulazione, così come l'induzione di anoikis, potrebbero quindi avere implicazioni terapeutiche.

Noi abbiamo indotto anoikis in cellule di carcinoma del colon mediante trattamento con inibitori delle Vacuolar-H⁺-ATPasi (V-ATPasi), enzimi localizzati sulle membrane intracellulari e plasmatiche delle cellule eucariotiche, responsabili del mantenimento del pH intracellulare. Infatti le V-ATPasi giocando un ruolo critico nell'equilibrio cellulare dei protoni proteggono la cellula dall'acidificazione prodotta nelle cellule tumorali dal metabolismo glicolitico, contribuiscono alla resistenza all'apoptosi, alla farmaco resistenza e alla capacità invasiva e metastatica delle cellule. NiK-12192 (Nikem Research, Milano, Italia), un inibitore delle V-ATPasi, causa una riduzione del volume e/o acidità dei lisosomi, una polarizzazione della distribuzione della integrina $\alpha\beta_5$, e un consistente numero di cellule vive e staccate dal substrato. Segnali di apoptosi si osservano solo dopo 72h di trattamento. Quindi, NiK-12192, interagendo sulla attività della V-ATPasi (e quindi del pH intracellulare) può causare una modificazione di strutture cruciali per l'adesione cellulare e indurre morte cellulare con una modalità mediata da anoikis.

Ringraziamenti: Questo lavoro è stato parzialmente supportato dalla Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro, Milano, Italia.

O6 APOPTOSIS IN MICROGRAVITY

Monici M.

*ASAcampus Joint Laboratori, ASA res. Div, Dip. Clinical
Physiopathology, University of Florence*

Gravitational alterations may have relevant effects on cell behaviour. Cell response to mechanical/gravitational stresses implies changes in morphology and function. A relationship seems to exist between reorganization of cell structures and integration of signal pathways leading to the modulation of gene expression.

Mechanotransduction, the process of translating external forces acting on a cell into a biological response, remains mostly unknown. Over the past decade, in vitro studies have indicated that mechanotransduction involves the extracellular matrix, integrins, calcium channels, guanosine triphosphatases (GTPases), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), etc., but cytoskeleton plays a central role, orchestrating multiple signal pathways that regulate major cell functions, such as proliferation, differentiation, apoptosis, adhesion and motility. Cell shape appears to be a critical determinant of cell function, because it is the resultant of an underlying balance of mechanical forces that in turn convey critical regulatory information to the cell.

In unloading conditions, the occurring cytoskeletal alterations are considered the major responsible for the strong increase in apoptosis described by many authors in a variety of cell types: osteoclastic precursors, lymphocytes, endothelial, glial and thyroid cells, etc...

In cells exposed to microgravity, mitochondrial damage induced by cytoskeletal disorganization and overexpression of Bax have been observed, supporting the hypothesis that the intrinsic pathway is involved. It is well known that Bax is a pro-apoptotic factor responsible for pore formation in mitochondrial membranes and permeabilization of the outer mitochondrial membrane is followed by release of proapoptotic proteins, able to activate caspases and then the apoptotic cascade. Moreover, the death receptor Fas and its ligand FasL have been found overexpressed, suggesting that also the extrinsic pathway is triggered.

However, in prolonged exposure (over 20 h) to altered gravitational conditions, at least a fraction of the exposed cell population seems to be able to reorganize the cytoskeletal structures and adapt their behaviour to the new conditions.

To increase our knowledge on the regulation of apoptosis by impact of mechanical/gravitational stresses on cell niche and cell cytoskeleton could be of consequence in many fields of biomedical research, from tissue engineering and regeneration to cancer treatment.

The speaker thanks:

-the other members of her research group Francesca Cialdai, Giovanni Romano, Franco Fusi, Antonio Conti, who are coauthors of many papers describing the studies here reported;

-the researchers Augusto e Marianne Cogoli, Daniela Grimm, Lucia Morbidelli, Nicola Marziliano, Susanna Benvenuti, Bianca Maria Uva, Maria Angela Masini, for collaboration.

COMUNICAZIONI ORALI



O7 APOPTOSI E RADIAZIONI

Aldo Becciolini

Università degli Studi di Firenze

O8 APOPTOSI E CAMPI ELETTROMAGNETICI

Ghibelli L.

Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

Magnetic fields (MF) include a huge set of electromagnetic radiations of different frequencies that interact with living matter through still unclear mechanisms. If potential therapeutic applications are documented since Mesmer's time in 18th century, and concern for possible harmful effect of domestic or occupational exposure was acknowledged since about 40 years, mechanistic analysis that may explain these broad range phenomena that affect, for good or for bad, human health have remained neglected for long time. On the one side, the current biophysical theory suggests that MF interfere with biological processes by affecting stability of radical pairs resulting from enzymatic hydrolysis processes. On the other, many biological experimental studies demonstrated that MF affect dynamic processes such as inflammatory cell activation, or tissue healing, whereas more static tissues/cells remain relatively unaffected. It is emerging that MF affect ongoing cellular processes rather than creating new ones, modulating signal transduction efficiencies, possibly performing a signaling, in addition to a stressor, role. We show here that MF activate a pro-survival pathway requiring pertussis toxin-sensitive G proteins and phospholipase C. This, possibly via a diacylglycerol lipase-involving step, liberates nitric oxide thereby activating plasma membrane Ca²⁺ channels of the non-capacitative type. The non-capacitative Ca²⁺ entry (NCCE) is required for this novel MF-induced, NO-dependent survival pathway, that we could mimic with the NO donor nitrosoglutathione; MF or GSNO indeed interfere with the apoptotic process, and allow clonal cell survival to cells challenged with damaging insults. Survival of damaged, possibly mutated cells provide a rationale to the well-established tumor promoting role of MF.

O9 APOPTOSIS INDUCED BY SPHAEROPHORIN AND PANNARIN, LICHEN METABOLITES, ON HUMAN MELANOMA CELLS

Caggia S.¹, Russo A.², Bevelacqua Y.¹, Stivala F.³, Mazzarino M.C.³, Cardile V.¹

¹Department of Physiological Sciences, University of Catania, V.le A. Doria 6, 95125, Catania, Italy

²Department of Biological Chemistry, Medical Chemistry and Molecular Biology, University of Catania, V.le A. Doria 6, 95125, Catania, Italy

³Department of Biomedical Sciences, University of Catania, Vai Androne 83, 95124 Catania

Introduction

Lichens are complex symbiotic organisms of fungi and algae and their metabolites have long been used by humans. These compounds, which comprise aliphatic, cycloaliphatic, aromatic, and terpenic compounds, are unique with respect to those of higher plants and show interesting biological and pharmacological activities. Melanoma is an aggressive, therapy-resistant malignancy of melanocytes. Currently, there is no effective long-term treatment for patients suffering from the advanced stages of this cancer. It is therefore of primary interest to search for new therapeutic agents that are able to prevent and contrast this aggressive tumor.

Aims

The growth inhibitory activity of two lichen compounds, sphaerophorin (depside) and pannarin (depsidone), against human melanoma cell line M14 was evaluated.

Methods

MTT assay was performed to quantify cell viability and proliferation in melanoma cells M14, maintained in absence or presence of sphaerophorin and pannarin at different concentrations (6-50 mM) for 72 hr. Lactic dehydrogenase (LDH) release in the culture medium was spectrophotometrically measured to examine the membrane permeability. Nuclear DNA fragmentation was analyzed using the COMET assay, a sensitive method for detecting DNA strand break in individual cells. The activity of caspase-3 was determined by using the caspase colorimetric assay kit and reactive oxygen species (ROS) determination was performed by using a fluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA).

Results

The data obtained show that sphaerophorin and pannarin inhibit the growth of melanoma cells, inducing an apoptotic cell death, demonstrated by fragmentation of genomic DNA (COMET assay) and by a significant increase of caspase-3 activity, and correlated, at least in part, to the increase of ROS generation.

Conclusions

The results confirm the promising biological proprieties of sphaerophorin and pannarin and may offer a further impulse to the development of analogues with more potent efficacy against melanoma cells.

COMUNICAZIONI ORALI



O10 BIOTOSSINE ALGALI CON DISTINTI MECCANISMI MOLECOLARI D'AZIONE INDUCONO MORTE CELLULARE CON PROCESSI CONVERGENTI SU MODIFICHE DEI PATTERN DI FOSFORILAZIONE NEL SISTEMA HSP 27

Sala G.L., Bellocchi M., Rossini G.P.

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia, Via Campi 287, I-41125 Modena

Introduzione

Le tipologie di morte cellulare sono distinguibili con marker molecolari e ultrastrutturali. Le differenze, tuttavia, non sono assolute e la complessità del quadro indica l'esistenza di elementi di convergenza fra diversi meccanismi molecolari di morte cellulare.

L'acido okadaico (AO) e la palitossina (PITX) sono sostanze naturali con potente attività biologica, distinguibili sia per struttura chimica che per meccanismo d'azione. L'AO agisce inibendo le maggiori fosfoproteine fosfatasi, mentre la PITX converte la Na^+, K^+ -ATPasi membranaria in un canale cationico non selettivo. Entrambe le tossine, tuttavia, causano morte cellulare con modalità che sono note solo in parte.

Scopi

In questo studio abbiamo utilizzato un modello sperimentale di cellule umane in coltura per studiare i meccanismi molecolari di tossicità di AO e PITX, valutando se le risposte di morte cellulare indotte dalle due diverse tossine comprendano componenti molecolari condivisi.

Metodi

L'indagine è stata condotta a livello sistemico, individuando le modifiche indotte da AO e PITX nel proteoma di cellule MCF-7. La caratterizzazione di risposte coinvolgenti proteine di rilievo ha compreso analisi mediante immunoblotting.

Risultati

L'analisi proteomica di estratti cellulari totali ha mostrato che il livello di espressione di trenta proteine è significativamente alterato in cellule MCF-7 esposte ad AO. Le proteine coinvolte nella risposta comprendono diverse isoforme di hsp 27. Analisi di hsp 27 mediante immunoblotting dopo separazione con elettroforesi bidimensionale hanno mostrato che cellule MCF-7 contengono basse concentrazioni di due isoforme fosforilate in Ser_{82} in condizioni basali, i cui livelli aumentano in seguito al trattamento con AO. Queste medesime isoforme sono aumentate anche in cellule MCF-7 esposte a PITX. Altre due isoforme di hsp 27 fosforilate in Ser_{82} sono rilevabili mediante immunoblotting di estratti preparati da cellule esposte ad AO.

Discussione

I risultati ottenuti mostrano che i meccanismi molecolari mediante i quali AO e PITX inducono la morte di cellule MCF-7 convergono verso la stabilizzazione di alcune isoforme di hsp 27, caratterizzabili da specifici set di fosforilazioni comprendenti il residuo Ser_{82} . I nostri risultati indicano che il destino cellulare nel nostro modello sperimentale è controllato dai livelli relativi delle diverse isoforme fosforilate di hsp 27.

Ringraziamenti: Queste indagini sono sostenute dal MUR (finanziamento 2007FXSCL2)

O11 IL CONTRIBUTO DELL'AUTOFAGIA NELL'APOPTOSI INDOTTA DA CISPLATINO IN CELLULE DI MELANOMA: SINERGIA O PROTEZIONE?

Del Bello B., Toscano M., Moretti D., Maellaro E.

Dipartimento di Fisiopatologia, Medicina Sperimentale e Sanità Pubblica, Sez. Patologia Generale - Università di Siena

Introduzione

Dati della letteratura hanno evidenziato che le cellule tumorali rispondono a numerosi trattamenti citotossici inducendo autofagia come meccanismo protettivo; tuttavia è stato anche dimostrato che l'autofagia è parte integrante del meccanismo citotossico di alcuni farmaci. Pertanto a tutt'oggi non è chiaro il contributo dell'autofagia nella morte per apoptosi di cellule tumorali.

Risultati

In questo studio, condotto su cellule di melanoma umano metastatico Me665/2/21 indotte in apoptosi dal cisplatino, si evidenzia un ruolo anti-autofagico di questo agente genotossico, come dimostrato dalla diminuzione del rapporto LC3II/LC3I, tipico marker di autofagia. Parallelamente si osserva una diminuita espressione di beclina-1 in cellule sia pre-apoptotiche che apoptotiche; tale diminuzione è parzialmente reversibile in presenza dell'inibitore delle caspasi-3/-7, DEVD-CHO, e si accompagna a formazione di un frammento di 50 kDa nelle cellule in apoptosi avanzata. Per capire se questa diminuita autofagia concorra alla morte apoptotica da cisplatino o, viceversa, vi si opponga, abbiamo co-trattato le cellule con un classico inibitore della prima fase dell'autofagia, la 3-Metiladenina (3-MA), inibitore di PI3K-classe III: il risultante aumento, seppur lieve, dell'entità della morte cellulare suggerisce un ruolo protettivo dell'autofagia nella morte per apoptosi.

In una prospettiva farmacologica di terapia combinata, abbiamo studiato la risposta citotossica al cisplatino in condizioni in cui l'autofagia viene stimolata, utilizzando il CCI-779, un estere dell'inibitore specifico di mTOR, rapamicina. La somministrazione di CCI-779 (1 nM -10 mM) non induce apoptosi ma produce solo un lieve effetto citostatico. Al contrario, il trattamento con CCI-779 + cisplatino aumenta considerevolmente l'apoptosi indotta dal solo cisplatino. L'analogo della rapamicina, come atteso, è un buon induttore di autofagia, valutata come progressivo aumento della ratio LC3II/LC3I; anche in questo caso il cisplatino tende a diminuire l'autofagia indotta da CCI-779. La 3-MA, pur essendo efficace nel diminuire la ratio LC3II/LC3I, non modifica l'entità della apoptosi, suggerendo che l'effetto sinergico da CCI-779 sulla morte cellulare non è dovuto all'induzione di autofagia.

Come da noi dimostrato in precedenza, il trattamento con cisplatino provoca attivazione di calpaine, che contribuiscono alla morte per apoptosi, e la cui inibizione (con MDL-28170 e calpeptina) esercita un effetto anti-apoptotico. In questo studio si evidenzia che l'inibizione delle calpaine induce anche un notevole incremento di autofagia, anche in questo caso, così come sulle cellule controllo e sulle cellule trattate con CCI-779, ridimensionato dal cisplatino. In queste condizioni, in cui l'aumento di autofagia si associa a protezione dalla morte, il trattamento con 3-MA inibisce l'autofagia e nel contempo attenua la protezione.

Conclusioni

Nel complesso i dati suggeriscono che l'autofagia, sia costitutiva che farmaco-indotta, non concorre alla morte per apoptosi, piuttosto svolge un ruolo protettivo.

COMUNICAZIONI ORALI



O12 IL RUOLO DELL'AUTOFAGIA APOPTOSI-INDIPENDENTE IN CELLULE DI OSTEOSARCOMA UMANO FARMACORESISTENTI

Condello M.¹, Lista P.¹, Federici E.², Arancia G.¹ and Meschini S.¹

¹Dipartimento di Tecnologie e Salute e ² Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, Roma, Italia.

Introduzione

Sebbene i protocolli chemioterapici convenzionali negli ultimi anni abbiano raggiunto notevoli progressi, migliorando la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti, gli studi nel settore oncologico proseguono con il costante impegno di comprendere i meccanismi alla base della farmacoresistenza delle cellule tumorali e di mettere a punto nuove strategie terapeutiche, con limitati effetti collaterali, per il superamento di questo complesso fenomeno. Nostri precedenti studi (Meschini et al. 2003, 2005) hanno dimostrato che l'alcaloide vegetale voacamina (VOA) è in grado di sensibilizzare cellule di osteosarcoma umano farmacoresistenti (U-2 OS/DX) all'azione citotossica della doxorubicina esercitando un'azione competitiva nei confronti della P-glicoproteina (Pgp).

Scopi

In questo studio si è voluto valutare l'effetto della VOA, non solo come agente chemiosensibilizzante somministrato a concentrazioni subcitotossiche in associazione con chemioterapici convenzionali, ma anche come agente citotossico, se usato da solo a concentrazioni maggiori. È stato dimostrato che la morte cellulare indotta dalla VOA non è attivata dall'induzione del pathway apoptotico, bensì di quello autofagico.

Metodi

A tale scopo sono state impiegate tecniche di immunocitochimica, microscopia elettronica a trasmissione e scansione, citofluorimetria a flusso, western blotting e RNA interference.

Risultati e discussione

Le prove sperimentali che l'effetto citotossico della VOA non è dovuto all'induzione dell'apoptosi derivano dalle osservazioni della morfologia dei nuclei, ben preservati, dall'assenza del picco subG1 nel profilo citofluorimetrico del ciclo cellulare e dalla scarsa esposizione della fosfatidilserina sulla superficie cellulare e, infine, dallo studio dei principali marker biochimici (PARP, Bcl-2). Per escludere che l'induzione della morte autofagica sia una risposta generale della linea cellulare e non dovuta in maniera specifica al trattamento con VOA, le cellule di osteosarcoma sono state trattate con doxorubicina e staurosporina, noti induttori di apoptosi. Entrambi gli agenti hanno dimostrato la tendenza delle cellule di osteosarcoma ad andare in apoptosi.

Le prime indicazioni sul coinvolgimento dell'autofagia derivano dalle osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione di cellule trattate con VOA, le quali presentano numerosi vacuoli autofagici, contenenti organelli e materiale in fase di degradazione. Esse sono state confermate andando a valutare l'espressione della proteina LC3, nota molecola associata agli autofagosomi, e la conversione dalla forma LC3-I (citofagica) alla forma LC3-II, legata alla membrana dell'autofagosoma. Tale conversione veniva notevolmente ridotta pretrattando le cellule con noti inibitori dell'autofagia. Inoltre, il silenziamento dei principali geni autofagici (*ATG5*, *ATG6*, *ATG7*, *ATG12*) riduceva in maniera significativa la citotossicità indotta dalla voacamina, rafforzando l'ipotesi che tale alcaloide induce morte cellulare autofagica sulle cellule di osteosarcoma umano farmacoresistenti e pertanto rappresenta un promettente agente chemioterapico.

O13 RUOLO DELL'APPARATO DEL GOLGI NELL'APOPTOSI INDOTTA DA DOXORUBICINA LIPOSOMIALE NON PEGILATA IN CELLULE DI CARCINOMA DELLA PROSTATA ORMONO-REFRATTARIO

Fabrizi F.¹, Carloni S.¹, Briigliadori G.¹, Ulivi P.¹, Tesesi A.¹, Montanari M.², Amadori F.¹, Zoli W.¹

¹Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori, Meldola; ²Oncology Unit, Ravenna Hospital, Ravenna, Italy

Introduzione - Scopi

L'efficacia terapeutica degli attuali trattamenti per il carcinoma della prostata ormono-refrattario è insoddisfacente e ciò rende indispensabile la ricerca di nuovi farmaci o strategie terapeutiche innovative. Obiettivi principali di questo lavoro sono la valutazione, *in vitro*, dell'attività e dei meccanismi d'azione di doxorubicina liposomiale non pegilata in cellule di carcinoma della prostata ormono-refrattario.

Metodi

Sono state utilizzate 2 linee cellulari di carcinoma della prostata ormono-refrattario, DU145 e DU145-R. Le cellule DU145 sono state ottenute dall'ATCC, mentre la linea DU145-R è stata ottenuta esponendo le cellule DU145 a concentrazioni crescenti di docetaxel per un mese. L'IG₅₀ del docetaxel nella linea DU145-R è 1,5 volte più alta rispetto a quella rilevata nelle cellule DU145. L'attività di doxorubicina (Doxo) e doxorubicina liposomiale non pegilata (Myocet®) è stata valutata mediante test SRB, l'induzione di apoptosi tramite saggio TUNEL. L'incorporazione e la localizzazione intracellulare del Myocet sono state analizzate mediante microscopia, l'espressione di CD95 e di GD3 tramite citofluorimetria, l'alterazione di marcatori proteici mediante western blot.

Risultati

Myocet ha dimostrato un'attività citotossica superiore a quella della Doxo in entrambe le linee cellulari, inducendo apoptosi nel 70% delle cellule dopo 72 ore di esposizione, già a concentrazioni pari ad 1/10 del picco plasmatico. Il farmaco si concentra principalmente nell'apparato del Golgi e induce un significativo incremento dell'espressione del recettore di morte CD95, del ganglioside GD3 e delle forme attive delle caspasi -2, -3 e -8. Myocet induce un decrescita dell'espressione della proteina anti-apoptotica Mcl-1, in modo più evidente nella linea DU145.

Discussione

Myocet ha dimostrato una notevole attività citocida sulle cellule di carcinoma della prostata ormono-refrattario, presumibilmente in seguito al raggiungimento di un'alta concentrazione intracellulare localizzata principalmente nell'apparato del Golgi. Agendo come sensore di stress cellulare, l'apparato del Golgi può potenziare l'effetto pro-apoptotico convenzionale indotto da antracicline, dipendente dal danno al DNA, promuovendo un incremento di espressione di CD95, GD3 e della forma attiva della caspasi-2. I nostri dati rafforzano l'ipotesi che l'induzione di morte cellulare possa esplicarsi anche attraverso organelli cellulari diversi dai mitocondri e che l'apparato del Golgi potrebbe essere un obiettivo ideale per la terapia antitumorale. L'attività del Myocet nelle cellule DU145-R raccomanda un approfondimento clinico di tale formulazione per il trattamento di seconda linea nei pazienti di carcinoma della prostata ormono-refrattario in progressione dopo docetaxel.

COMUNICAZIONI ORALI



O14

IL RECLUTAMENTO DELL'ANTIGENE CD99 INDUCE APOPTOSI NELLE CELLULE DI SARCOMA DI EWING ATTRAVERSO L'ATTIVAZIONE DI P53

Guarzony C., Garofalo C., Manara M.C., Picci P. e Scotlandi K.

Laboratorio di Oncologia Sperimentale, Istituto Ortopedico Rizzoli, Via di Barbiano 1/10, 40136 Bologna

Introduzione

Il CD99 è una glicoproteina di membrane di 32 KDa, la cui espressione è costantemente associata ad una classe di tumori ossei infantili caratterizzati da scarsa prognosi, Ewing's Sarcomas Family of Tumors (EWSFT). Il ruolo di questo antigene non è ancora stato completamente delucidato, tuttavia l'impiego di anticorpi specifici rivolti contro il CD99 ne hanno agevolato lo studio funzionale e molecolare, richiamando l'attenzione alle specifiche vie di trasduzione del segnale ed identificandolo come promettente target nella terapia del sarcoma di Ewing.

Scopi e Metodi

Al fine di chiarire i meccanismi molecolari responsabili dell'attivazione del processo apoptotico nelle cellule di sarcoma di Ewing (SE) stimulate con anticorpi monoclonali rivolti verso il CD99, abbiamo valutato gli effetti dell'anticorpo O662 tramite analisi Microarray e Phosphoarray. Successivamente sono state effettuate validazioni specifiche attraverso western blotting in svariate linee cellulari di sarcoma di Ewing.

Risultati

Il reclutamento del CD99 è in grado di modulare numerosi processi biologici quali: I) adesione; II) migrazione e metastasi; III) regolazione del ciclo e del signaling cellulare; IV) apoptosi e death receptor signaling. I risultati ottenuti concordano con dati precedentemente pubblicati sugli effetti dell'anticorpo O662 in vitro ed in vivo (Scotlandi et al. 2000): l'anti-CD99 mAb induce, infatti, aggregazione omotipica e rapida induzione di morte cellulare delle cellule Sarcoma di Ewing, con conseguente inibizione della crescita e riduzione del potenziale metastatico e clonogenico. In seguito a trattamento con O662, si evidenzia il reclutamento di p53 e del suo regolatore di stabilità, MDM2, piuttosto che una diretta attivazione delle caspasi. Inoltre si evidenzia una maggior suscettibilità all'apoptosi nelle linee p53^{+/+} o con mutazioni puntiformi p53 piuttosto che linee con alterazioni grossolane della proteina TP53; in queste ultime, a differenza delle prime, non si riscontra espressione di target specifici di p53 (p21, BAX). Infine il coinvolgimento di p53 spiegherebbe la maggior suscettibilità su tumori primitivi e metastasi del trattamento combinato con anticorpi monoclonali anti-CD99 e Doxorubicina (Scotlandi et al. 2006).

Discussione

La miglior comprensione dei meccanismi molecolari fisiopatologici del Sarcoma di Ewing e del ruolo dell'antigene CD99 potrebbe consentire di stabilire nuove combinazioni di terapie molecolari mirate al potenziamento della risposta apoptotica scatenata da O662 mAb nella terapia del Sarcoma di Ewing, come ad esempio inibitori dell'interazione p53-MDM2.

Ringraziamenti: Fabiola Moretti, Ludwig Schaefer.

O15

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL IKAROS SPLICE VARIANT AND ITS INVOLVEMENT IN APOPTOSIS

Capecce D, Mancarelli MM, Iansante V, Verzella D, Fischietti MM, Di Tommaso A, Di Ianni M, Zazzeroni F, Gulino A, Alesse E.

Università degli Studi de L'Aquila, Dipartimento di Medicina Sperimentale, via Vetoio, 67100- L'Aquila

Ikaros is a Krüppel-like zinc-finger transcription factor involved in the regulation of hemopoiesis; in fact, this protein plays a key role in the control of proliferation and differentiation of the lymphoid lineage. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse transcription factors derived from alternative splicing of pre-mRNA. The short splice variants bind the DNA-binding isoforms and exert a dominant negative effect by inhibiting their binding to the target promoters of lymphoid-related genes.

Ikaros is a tumor suppressor gene that negatively regulates cell cycle; inactivating mutations in this gene or the over-expression of dominant negative forms of Ikaros (DN) are associated with the development of lymphoproliferative disorders, because of an up-regulation of proliferation and survival signals. Particularly, the research is increasingly focusing on the deregulation of alternative splicing of pre-mRNA of Ikaros, this event being implicated in the initiation and progression of several forms of leukemia.

In the peripheral blood lymphocytes (PBL) we have isolated a new Ikaros splice variant, structurally related to the dominant negative isoforms, which we called Ikaros N. We have found that Ik-N is able to functionally inhibit Ikaros DNA-binding isoforms, in part by their cytoplasmic sequestration. We have evaluated the biological effects of Ik-N over-expression both in terms of cell proliferation and cell death; particularly Ik-N promotes cell proliferation and its over-expression is associated with enhanced protection against apoptosis. Finally, in order to clarify the pathogenetic role of Ik-N in hematological malignancies we have investigated the mRNA expression of this DN isoform in samples from patients with lymphoproliferative disorders.

The understanding of the molecular mechanisms underlying the genesis of hematological malignancies is crucial to identify new diagnostic tumor markers and new targets for cancer therapy.

COMUNICAZIONI ORALI



O16 APOPTOSI E AUTOFAGIA NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

Forloni G.

Dipartimento di Neuroscienze, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Via G. La Masa – Milano

Le principali malattie neurodegenerative sono caratterizzate da una vulnerabilità selettiva di specifici sistemi neuronali, il sistema colinergico basocorticale e ippocampale nell'Alzheimer (AD), quello nigro-striatale nel Morbo di Parkinson (PD), i motoneuroni nella Sclerosi Laterale Amiotrofica e i neuroni striatali nella corea di Huntington. Tuttavia a fronte di questa relativa specificità, confermata anche dagli studi più recenti, i meccanismi di base proposti per spiegare il processo neurodegenerativo sono spesso comuni, tra questi la presenza del *misfolding* proteico e di un ruolo patogenetico degli aggregati di specifiche proteine è quello evidenziato più recentemente. L'accumulo di proteine può avvenire a livello intra o extra-cellulare, o addirittura intranucleare. Il coinvolgimento degli aggregati proteici nel processo neurodegenerativo è più evidente nell'accumulo extracellulare di β amiloide in AD e, a livello citoplasmatico, della α -sinucleina nei corpi di Lewy che caratterizzano il PD. Nelle malattie neurodegenerative la morte delle cellule nervose è un fenomeno fondamentale ma che avviene molto a valle nel processo patologico che, tranne poche eccezioni, si sviluppa nel corso di anni o di decenni. In passato abbiamo dimostrato che l'esposizione di neuroni a peptidi β amiloide induceva una morte per apoptosi, studi successivi hanno caratterizzato nel dettaglio il fenomeno che è stato confermato anche da evidenze neuropatologiche. Più recentemente sono stati identificati piccoli aggregati di β amiloide solubili, gli oligomeri, come responsabili dei fenomeni neurodegenerativi. Tuttavia accanto alla disfunzione neuronale attivata dagli oligomeri dall'esterno della cellula, un certo rilievo stanno avendo i meccanismi intracellulari, la cui attivazione dipende sempre dagli oligomeri di β amiloide e che coinvolge il sistema autofagosoma.lisosomiale. Sembra infatti che la distrofia dei neuriti, un evento precoce in AD, correli con un aumento dei vacuoli autofagici, ad indicare una perdita di efficienza di questo sistema di degradazione. Nel PD, poiché l'accumulo di α -sinucleina avviene a livello intracellulare, la compromissione dei sistemi degradativi dei principali sistemi proteolitici associata allo stress ossidativo è ritenuta il fenomeno patogenetico più rilevante. A lungo ci si è concentrati sul ruolo del sistema ubiquitina proteosoma (UPS) che risulta compromesso in PD, sia per alterazioni dirette di origine genetica che indirette dovute ad una ridotta attività mitocondriale. Poiché il sistema autofagico riesce a compensare un'inefficiente degradazione proteica ad opera di UPS, è probabilmente da un cattivo funzionamento di entrambi i sistemi che si arriva all'accumulo di α -sinucleina. In accordo con questa indicazione, in un sistema cellulare dove la produzione di α -sinucleina, viene indotta, noi abbiamo dimostrato che il blocco del sistema macroautofagico ma non quello dell'UPS produce un accumulo della proteina e morte cellulare. In generale sempre più evidenze attribuiscono al sistema lisosomiale autofagico un ruolo rilevante nello sviluppo dei fenomeni neurodegenerativi, l'approfondimento di questo fenomeno può aprire nuove prospettive terapeutiche in un contesto estremamente carente di approcci efficaci.

O17 ROLE OF TGF-B IN THE DEVELOPMENT OF HUMAN TH17

Santarasci V., Maggi L., Capone M., Frosali F., Querci V., Liotta F., Cosmi L., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F.

Centre of Excellence DENOthe, University of Florence, Italy

The adaptive effector CD4+ Th-mediated immune response is highly heterogenous, based on the development of distinct subsets which are characterized by different profiles of cytokine production. Initially, two polarized forms of Th effectors, named as Th1 or Th2, were identified in both mice and humans. Th1 cells produce IFN- γ and are mainly devoted to the protection against intracellular microbes, whereas Th2 cells produce IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13 and are involved in the protection against gastrointestinal nematodes, but are also responsible for allergic disorders. More recently, a third subset of CD4+ effector T cells which produce IL-17 has been described in mice, which was named as Th17 afterwards. At least in mice, Th17 cells seem to provide protection against infections by extracellular bacteria and fungi, but their major role appears to be the involvement in the pathogenesis of chronic inflammatory disorders, including some murine models of autoimmune diseases. Recently, by using the microarray assay we found that CD161 was one of the most up-regulated genes in human Th17, in comparison with Th1 or Th2, clones. Accordingly, T-blasts from all Th17 clones expressed CD161 on their surface, whereas all Th1 or Th2 clones examined were CD161-. All IL-17-producing cells were found to be included within the CD161+ fraction of adult circulating CD4+ T cells. When CD161+ or CD161- cells were sorted from umbilical cord blood (UCB) naive CD4+ T cells and activated in presence of IL-1b plus IL-23, Th17, Th17/Th1 or Th1 cells developed from the CD161+ fraction, whereas CD161- cells could never be induced to differentiate into IL-17-producing cells.

Human Th17 clones and circulating Th17 cells showed lower susceptibility to the anti-proliferative effect of TGF-b than Th1 or Th2 clones or circulating Th1- or Th2-oriented T cells, respectively. Accordingly, human Th17 cells exhibited lower expression of clusterin, and higher Bcl-2 expression and reduced apoptosis in presence of TGF-b in comparison with Th1 cells. Umbilical cord blood (UCB) naive CD161+CD4+ T cells, which contain the precursors of human Th17 cells, did not differentiate into IL-17A-producing cells in response to TGF-b alone. Indeed, TGF-b inhibited Th1 development. These data suggest that TGF-b is not critical for the differentiation of human Th17 cells, but indirectly favours their expansion because Th17 cells are poorly susceptible to its suppressive effects.

COMUNICAZIONI ORALI



O18 **APOPTOSIS NELLA RISPOSTA IMMUNE AI TUMORI**

Parmiani G., Maccalli C., Rivoltini L.

Unità di Immuno-Bioterapia dei Tumori Solidi, Istituto Scientifico e Universitario Fondazione San Raffaele, Milano e Unità di Immunoterapia dei Tumori Umani, Fondazione Istituto Nazionale Tumori, Milano

L'apoptosi è un fenomeno di grande importanza nella terapia biologica dei tumori per almeno due ragioni. Infatti da un lato è noto che le cellule tumorali hanno una aumentata resistenza alla apoptosi, soprattutto a quella indotta da diversi farmaci, dall'altro possono provocare esse stesse l'apoptosi di cellule normali che difendono il nostro organismo dal tumore in crescita come i linfociti T. Nel secondo caso l'apoptosi dei linfociti contribuisce alla capacità del tumore di sfuggire alla reazione immunologica. Una molecola coinvolta in questo fenomeno è FasLigando che abbiamo visto essere espressa da cellule tumorali umane come quelle del melanoma e del carcinoma del colon. L'interazione dunque di queste cellule tumorali esprimenti FasL con linfociti T attivati esprimenti Fas può condurre alla morte del linfocita (contrattacco). Tuttavia FasL è rapidamente rilasciato dalle cellule tumorali e si può ritrovare nel sangue dei pazienti in una forma solubile ma probabilmente poco attiva. Noi abbiamo dimostrato con analisi PCR che FasL è però costantemente presente nel citoplasma delle cellule di melanoma. Inoltre la capacità di indurre apoptosi nei linfociti da parte delle cellule di melanoma non si manifesta nei confronti di cloni di linfociti T Fas+ ma pre-stimolati con antigeni melanoma-associati quali MelanA o gp100 suggerendo che cellule già funzionalmente attivate e differenziate in senso citotossico possano impedire la trasmissione del messaggio apoptotico attraverso Fas/FasL.

Apoptosi indotta nelle cellule tumorali con diversi meccanismi da parte di agenti chemioterapici o radioterapia può promuovere un aumento nel rilascio di antigeni localmente o a livello sistemico e indurre una più forte risposta immunitaria nel confronto del tumore. Dati ottenuti in vitro nel melanoma umano a sostegno di questa ipotesi verranno presentati.

O19 **APOPTOSI NEL DIABETE**

Davide Lauro

Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

O20 **APOPTOSI NELLE PATOLOGIE OFTALMOLOGICHE**

Carlo Nucci

Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

O21 **APOPTOSI, ATROFIA MUSCOLARE E CACHESSIA**

Costelli P.

Dipartimento di Medicina e Oncologia sperimentale, Università di Torino

Diverse patologie croniche quali diabete, tumori, malattie autoimmunitarie e neurodegenerative, sono caratterizzate da marcata perdita di massa muscolare, prevalentemente associata ad aumentati tassi di degradazione proteica. I meccanismi alla base di questa condizione di ipercatabolismo proteico muscolare sono stati chiariti solo in parte. Recentemente è stato proposto che la ridotta trasduzione dei segnali dipendenti da insulina/IGF-1 possa giocare un ruolo importante. Tuttavia, diversi studi clinici e sperimentali hanno suggerito che anche la perdita cellulare possa contribuire alla deplezione muscolare. In particolare, è stato riportato che l'atrofia muscolare che si osserva in patologie degenerative quali distrofie, encefalomiopatie, sclerosi laterale amiotrofica e insufficienza cardiaca cronica possa essere associata a riduzione del numero di mio nuclei, probabilmente dovuta ad attivazione dell'apoptosi.

Nell'ambito delle patologie associate ad atrofia muscolare, viene rivolto un particolare interesse alla cachessia neoplastica, una sindrome complessa che si sviluppa frequentemente nei pazienti oncologici, compromettendone la qualità di vita e la tolleranza alle terapie antitumorali. Alcune osservazioni effettuate su modelli sperimentali suggeriscono che l'apoptosi contribuisca in maniera determinante alla patogenesi della perdita di massa muscolare che si osserva in corso di cachessia. La situazione non è invece altrettanto chiara per quanto riguarda la patologia umana. La letteratura, infatti, riporta sia la presenza che l'assenza di eventi apoptotici nel tessuto muscolare di pazienti neoplastici, rendendo evidente la necessità di approfondire gli studi in questa direzione. Ringraziamenti: MIUR, Regione Piemonte, Università di Torino, AIRC

COMUNICAZIONI ORALI



O22 APOPTOSI E VIRUS

Mastino A., Sciortino M.T., Medici M.A., Marino-Merlo F.

Dipartimento di Scienze della Vita "M. Malpighi", Università di Messina, Messina

La risposta cellulare apoptotica rappresenta un'importante forma di difesa antivirale di prima linea, in grado di contenere efficientemente la replicazione e la diffusione dei virus. In particolare, questa difesa può essere considerata la più primordiale forma di risposta cellulare degli organismi multicellulari ai virus, risultando comune a tutti i *phyla* dei metazoi, comprese le piante, che mancano di un sistema immune basato su cellule mobili a funzioni specializzate. Come conseguenza di ciò, la co-evoluzione di ospiti e virus ha determinato la capacità di questi ultimi di esser dotati di una molteplice varietà di strategie di sopravvivenza per sfuggire all'eliminazione mediante apoptosi. D'altro conto, l'altra faccia della medaglia rappresentata dalla morte cellulare apoptotica, è quella che riconosce in essa proprio un meccanismo attraverso cui alcuni virus esercitano la loro azione patogenetica, traendo proprio vantaggio da questa forma di difesa innata. Negli ultimi anni sono stati raccolti numerosissimi dati sugli eventi molecolari coinvolti in questi fenomeni. Dopo una breve review sullo stato dell'arte delle relazioni tra apoptosi e virus ed averne discusso gli aspetti generali, verranno presentati, a titolo esemplificativo, alcuni dei risultati delle ricerche, eseguite presso il laboratorio di cui il relatore è responsabile durante l'ultima decade, sulle relazioni tra virus herpes simplex (HSV) ed apoptosi. Tali virus sembrano infatti in grado di esercitare un fine controllo sull'apoptosi delle cellule infettate, di tipo positivo o negativo, a seconda della presenza od assenza di specifici geni virali, condizioni sperimentali o specificità del target cellulare.

Ringraziamenti: Ricerche eseguite nell'ambito di Progetti PRIN finanziati dal MIUR

O23 AMPK INHIBITION INDUCES APOPTOSIS IN PEDIATRIC B-ALL CELLS WITH MLL GENE REARRANGEMENTS

Accordi B.1, Espina V.2, Giordan M.1, VanMeter A.J.2, Galla L.1, Milani G.1, Sciro M.1, De Maria R.3, te Kronnie G.1, Petricoin E.F.2, Liotta L.A.2, Basso G.1

1Oncohematology Laboratory, Department of Pediatrics, University of Padova, Italy, 2Center for Applied Proteomics and Molecular Medicine, George Mason University, VA, USA., 3Department of Hematology, Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Italy

INTRODUCTION

Remarkable progress has been made in the past decade in pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) treatment, reaching cure rates of about 80%, but therapy is not yet effective in all cases. Infants with MLL gene rearrangements form the most striking example of patients who have not benefited from the improved treatment regimens. Consequently, current interest focuses on identifying new specific molecular targets to find new patient-tailored therapies. Thus, to identify aberrantly activated signal transduction pathways in MLL-rearranged patients, we used Reverse Phase Protein Microarrays (RPMA). We further investigate RPMA results with *in vitro* studies testing the effects of a specific kinase inhibitor on apoptosis induction in leukemia cell lines.

METHODS

We compared with RPMA the signal transduction pathways working state of 8 MLL-rearranged patients vs 41 without known genomic translocations ones. Phosphorylation status of 92 signalling proteins was analyzed. Based on RPMA results, we tested through proliferation and apoptosis assays the effect of Compound C, a specific AMPK inhibitor, on selected B-ALL human cell lines: 2 MLL-rearranged (SEM and RS4;11) and 2 non-translocated (MHH-CALL-2 and MHH-CALL-4). To characterize the mechanism of Compound C-induced apoptosis we are performing cell cycle and other apoptotic markers analyses (Western Blot and flow cytometry).

RESULTS

MLL-rearranged patients show an hyperactivated pathway that, through AMPK phosphorylation, leads to BCL-2 activation. Selected cell lines respond very differently to AMPK inhibition. GI50 (Growth Inhibition) at 48h is 0.2 μ M for SEM, 3 μ M for RS4;11, and 26 μ M for non-translocated cell lines. LC50 (Lethal Concentration) at 48h is 7.5 μ M for SEM, 8.5 μ M for RS4;11 and 38 μ M for non-translocated cell lines. Cell cycle analyses performed at GI50 reveal an arrest at G2/M phase. Additional experiments to better describe Compound C-induced apoptosis are in progress.

CONCLUSIONS

Our results thus demonstrate that the AMPK pathway is hyperactivated in MLL-rearranged patients, and it appears to directly contribute to the survival of MLL-rearranged cells. This study emphasizes the importance of protein pathway analysis as a route for discovery of functional derangement that may be functional, causative agents of cancer. Our data suggest AMPK as a new molecular target and encourage further studies of AMPK inhibitors as potential new drugs for treatment of MLL rearranged leukemia patients.

Ringraziamenti

This work was supported by grants from the Istituto Superiore di Sanità, the Fondazione Città della Speranza, the Associazione Italiana Ricerca sul Cancro, the PRIN MIUR, and the GMU College of Science

COMUNICAZIONI ORALI



O24 RUOLO DELLE CELLULE NATURAL KILLER (NK) NELLA FISIOPATOLOGIA DELL'INFEZIONE DA HIV-1

Mavilio D.

*IRCCS, Istituto Clinico Humanitas, Via A. Manzoni 113,
Rozzano, Milano, Italia*

Lo studio della fisiopatologia della risposta immunitaria contro patogeni virali rappresenta ancora una delle sfide più importanti della moderna ricerca biomedica. La mancanza di terapie risolutive ed il fallimento di diversi trial vaccinici contro HIV-1 sono una diretta conseguenza dei troppi punti interrogativi ancora legati alla patogenesi dell'infezione. La nostra ricerca ha contribuito ad evidenziare le principali disfunzioni dell'immunità innata che permettono al virus HIV-1 di aggirare facilmente la risposta immunologica. In particolare abbiamo dimostrato che alti livelli di viremia inducono la comparsa di sottopopolazioni cellulari NK patologiche, raramente presenti in soggetti normali. Questi subset di cellule aberranti sono caratterizzati da attività citolitiche ed antivirali molto basse, se non addirittura assenti. Tale anergia compromette in modo rilevante la fisiologica capacità delle cellule NK di effettuare immuno-sorveglianza contro tutti i tumori e le infezioni. Inoltre, le anomalie fenotipiche e funzionali delle cellule NK patologiche alterano anche le interazioni tra cellule NK e Cellule Dendritiche: queste alterazioni impediscono il corretto sviluppo di una risposta antigene specifica contro il virus HIV-1 ed, al contrario, favoriscono il propagarsi dell'infezione stessa nei tessuti linfoidi. Infine, l'identificazione di sottopopolazioni cellulari NK patologiche riflette anche gli stadi clinici dell'infezione e la corretta risposta alla terapia antiretrovirale. In tal senso, la caratterizzazione fenotipica di alcune molecole espresse sulle cellule NK in pazienti HIV-1 potrebbe essere proposta come un nuovo marcatore di malattia. Nel prossimo futuro ci proponiamo di trasferire le nostre scoperte sperimentali sia nella pratica clinica giornaliera (uso delle cellule NK come marcatori di malattia) sia nello sviluppo di strategie terapeutiche alternative.

Ringraziamenti - A tutti i pazienti HIV-1 infetti che hanno generosamente e coraggiosamente contribuito a fare in modo che questa ricerca fosse possibile.

A tutti coloro che hanno partecipato a questo progetto.

O25 ROLE OF ENDOPLASMIC RETICULUM (ER) STRESS IN APOPTOSIS INDUCED BY LIPOIC ACID

Camboni T., Pibiri M., Leoni V.P., Columbano A., Ledda-Columbano G.M., Simbula G.

Department of Toxicology, University of Cagliari, Cagliari, Italy

Introduction The term "endoplasmic reticulum stress" defines any perturbation that compromises the protein folding functionality of the ER. ER stress leads to a cell stress response, the Unfolded Protein Response (UPR), which is aimed initially at compensating for damage but can eventually trigger apoptosis if ER dysfunction is prolonged. The activation of protective mechanisms against consequences of ER malfunction are recognized as key concepts in cancer cell biology. Although cell stress response represents homeostatic mechanism allowing cells to survive in presence of the altered functions of the ER, it is not clear how these mechanism interact with signalling pathways controlling apoptosis. Understanding the links between ER stress and apoptosis may be approached using drugs able to induce ER stress responses in cancer cells. α -lipoic acid (LA), a natural antioxidant, was suggested to be a potential cancer preventive agent since it induces apoptosis of some cancer cell types. Aim Recently, we have shown that LA induces apoptosis in hepatoma cells which is preceded by alteration in redox state. Since alteration in redox state has often been implicated in ER stress induction, the aim of this study was to determine whether LA induces ER stress in hepatoma cells, Fao, and eventually to elucidate the role of ER stress responses in LA-induced apoptosis. Materials and Methods Cell viability was determined by NRU assay. Protein expression was determined by Western blot. RT-PCR was performed to analyze XBP1 mRNA splicing. Results Treatment of Fao cells with LA causes a progressive increase in the expression of a well known marker of ER stress, GRP78. Furthermore, apoptosis LA-induced is associated to the activation of two parallel pathways related to UPR and involved in apoptosis, named IRE/XBP1 and PERK/CHOP. Discussion These findings demonstrate that ER stress plays a crucial role in LA-induced apoptosis of hepatoma cells. Further investigations will be required to elucidate the spectrum of pathophysiological significance of the induction of the ER stress in tumor cells in order to facilitate a more selective tumor-cell targeting than that achieved by conventional therapy.

COMUNICAZIONI ORALI



O26 CPH6 IS A NOVEL INHIBITOR OF HISTONE ACETYLTRANSFERASES IN CANCER CELLS

Del Bufalo D.

Laboratorio Chemioterapia Sperimentale Preclinica, Istituto Regina Elena, Roma

Chromatin structure, and thereby transcription, is controlled by the level of histones acetylation, which is determined by a balance between histone acetyl transferase (HATs) and histone deacetylase (HDACs) activities. Hence, the post-translational modification of proteins by HATs or HDACs plays an important role in the control of gene expression, and its deregulation has been linked to malignant transformation and other diseases. Although histone deacetylases inhibitors have been extensively studied and several of them are currently in clinical trials, there is little information available on inhibitors of HATs. Here, we present the biological properties of a cyclopentylidene-4[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl]hydrazone (CPH6), previously discovered as inhibitor of HAT activity through a phenotypic screening in yeast. CPH-6 was selected, between 4 different synthesized thiazole compounds, based on its strong inhibitory effect on the growth of several human tumor cell lines. We demonstrated that CPH6 inhibits cell growth of leukemia cell lines, decreases total acetylation of histones H3 in a time-dependent manner, and counteracts the acetylating action of the HDAC inhibitor Trichostatin A. A perturbation of cell cycle distribution (G1 phase arrest and concomitant S phase depletion) and an induction of apoptosis were also observed after treatment with CPH6. In conclusion, our study suggests that CPH6 could be a promising agent for anticancer therapy.

O27 INVECCHIAMENTO, SENESCENZA E APOPTOSI NELLA TERAPIA ANTIANGIOGENICA

Albini A.

Gruppo Multimedica, IRCCS, Milano

Endothelial cell senescence and apoptosis is a feature of numerous pathologies, including atherosclerosis, allograft vasculopathy, heart failure, diabetic retinopathy and scleroderma. In contrast, endothelial activation and replication associated with vessel proliferation and angiogenesis is now a therapeutic target in other diseases such as cancer and macular dystrophy. Preventive medical approaches, in particular cardiovascular and cancer chemoprevention, commonly target the endothelium, a concept we termed angioprevention. There is an intricate interplay between endothelial cell senescence and apoptosis during angioprevention, anti-angiogenic therapy and standard cancer chemotherapy. Microarray data on senescent endothelial cells or endothelial cells treated with angiopreventive compounds in vitro shows many genes that are similarly modulated in both conditions. Our data indicate that effective drugs may induce endothelial senescence. However, drug targeting remains a key issue, we have examined the potential of nanoparticles, and in particular single walled nanotubes (SWCNTs), as potential vehicles for anti-angiogenic drugs. SWCNTs when injected intravenously in vivo appear to be tolerated; Raman spectra analyses of tissues suggested accumulation within the liver and spleen, indicating capture by the reticuloendothelial cell system (RES). We then Tested the effects of these structures on endothelial cells in vitro. SWCNTs did not cause significant apoptosis or necrosis, although activation of autophagy pathways were observed in electron microscopy. Our data indicate that SWCNTs transiently accumulate in the lysosomal apparatus of endothelial cells. The SWCNTs appear to collect around the cells and penetrate into cellular structures, creating local stress.

O28 APOPTOSIS AND SURVIVAL IN ONCOLOGY

Nicolin A.

Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica- Università degli Studi di Milano – Via Vanvitelli 32, 20129 Milano

AKT kinase mediates signalling pathways downstream of activated tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). The PI3K/AKT pathway can be activated by a variety of extracellular signals and regulates diverse cellular processes including cell proliferation and survival, cell size and response to nutrient availability, tissue invasion and angiogenesis. PI3K transmits the mitogenic signals through AKT to the mammalian target of rapamycin (mTOR). mTOR is a serine/threonine kinase which controls protein synthesis, cell cycle progression, cell proliferation, and tumor growth. We have recently shown a role of mTOR in the regulation of apoptosis induced by microtubule-damaging agents, such as taxol and nocodazole. We investigated whether AKT, the upstream activator of mTOR in survival signalling, might regulate the death signals triggered by anti-microtubule drugs. We found that genetically modified AKT regulates Bcl-2 phosphorylation and cell death induced by taxol and nocodazole. These effects, inhibited by rapamycin, indicate that the PI3K/AKT/mTOR pathway can regulate both survival and death signals simultaneously. Our findings support a switch role for mTOR in regulating life or death signals: the down-regulation of the AKT/mTOR survival pathway strengthens the death signals induced by microtubule damage, whereas the up-regulation of the survival signalling converging on mTOR inhibits the microtubule-related apoptotic program. According to our model, we demonstrated that the synergy between inhibition of growth factor pathway and stimulation of microtubule-dependent apoptotic pathway—both of them converging on mTOR— can promote a decrease of Bcl-2 level, enhancing the tumor cell sensitivity to apoptosis induced by anticancer agents. Recent studies show that down-regulation of AKT can lower the apoptotic threshold and render cancer cells sensitive to the drug treatment. We explored this possibility in a panel of prostate cancer cells where mutations of the phosphatase PTEN activate the kinase cascade PI3K/AKT/mTOR. Silencing AKT efficiently sensitized cells to anti-microtubule agents in PTEN-mutated cells. This study showed that in prostate tumor cells in which the survival pathway is up-regulated by the mutated PTEN, down-regulation of AKT kinase can reactivate the apoptotic pathway and the drug responsiveness as well. Overall our findings have relevance for cancer therapy as they indicate the molecular mechanisms by which inhibition of the survival cascade upstream of mTOR can potentiate the death cascade. Ringraziamenti: We thank Drs Susan W Y Chen and Peter R. Shepherd (University College London, London, United Kingdom) for the α -P-mTOR antibodies and Dr Alberto Gulino for Akt plasmids. This work was supported by grants from MIUR and Istituto Superiore di Sanità.

COMUNICAZIONI ORALI



O29 STRATEGIE FARMACOLOGICHE PER IL SUPERAMENTO DELLA CHEMIORESISTENZA TUMORALE

Mini E.

Università degli Studi di Firenze

O30 CARBONIC ANHYDRASE INHIBITION FOR DESIGNING ANTITUMOR AGENTS AND DIAGNOSTIC TOOLS

Supuran C.T.

Laboratorio di Chimica Bioinorganica, Università degli Studi di Firenze, Rm 188, Via della Lastruccia 3, I-50019 Sesto Fiorentino, Firenze, Italy. claudiu.supuran@unifi.it

Carbonic anhydrases (CAs), a group of ubiquitously expressed metalloenzymes, are involved in numerous physiological and pathological processes, including gluconeogenesis, lipogenesis, ureagenesis, tumorigenicity and the growth and virulence of various pathogens. In addition to the established role of CA inhibitors (CAIs) as diuretics and antiglaucoma drugs, it has recently emerged that CAIs could have potential as novel anti-obesity, anticancer and anti-infective drugs. Furthermore, recent studies suggest that CA activation may provide a novel therapy for Alzheimer's disease. This contribution discusses the biological rationale for the novel uses of inhibitors or activators of CA activity in multiple diseases, mainly cancer, and highlights progress in the development of specific modulators of the relevant CA isoforms, some of which are now being evaluated in clinical trials (1).

(1) Supuran, C.T. *Nature Rev. Drug Discov.* 2008, 7, 168-181.

O31 APOPTOSI O AUTOFAGIA NELLA REGRESSIONE DEI TUMORI STROMALI GASTROINTESTINALI TRATTATI CON IMATINIB?

Negri T.

Laboratorio di Patologia Molecolare Sperimentale, Dipartimento di Anatomia Patologica, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

Introduzione

I Tumori Stromali Gastrointestinali (GIST), caratterizzati spesso da mutazioni attivanti nel gene *c-kit*, vengono trattati con successo con Imatinib, inibitore di recettori tirosin-chinasici quali KIT e PDGFRA. Il grado di regressione tumorale dovuta al farmaco viene valutata sui pezzi operatori dei pazienti trattati, che vengono analizzati morfologicamente e definiti in risposta più o meno marcata. Nonostante sia riportato in letteratura che Imatinib provochi apoptosi in linee cellulari di GIST, l'analisi morfologica di tali pezzi operatori suggerisce che il farmaco causi autofagia e non apoptosi.

Scopi

Chiarire se la regressione tumorale che caratterizza i pezzi operatori in risposta ad Imatinib sia dovuta ad autofagia o ad apoptosi.

Metodi

Campioni di pezzi operatori di 11 pazienti affetti da GIST e trattati con Imatinib e di 2 pazienti non trattati, utilizzati come controllo, sono stati analizzati mediante biochimica (immunoprecipitazione/Western blotting) ed immunisto chimica, avendo a disposizione sia materiale congelato che fissato in formalina ed incluso in paraffina. La regressione patologica dei campioni dopo trattamento con Imatinib è stata valutata come indice di risposta al trattamento.

Risultati

L'espressione di proteine correlate all'autofagia (beclina 1, PI3KIII, LC3-II) e la loro interazione (complesso beclina 1/PI3KIII) sono state dimostrate nei campioni di GIST analizzati, a differenza dei marcatori dell'apoptosi (caspasi e lamina A/C clivate) che non sono risultati espressi.

Conclusioni

I risultati ottenuti suggeriscono che l'autofagia caratterizza i GIST ed il loro trattamento con Imatinib induce autofagia e non apoptosi.

Ringraziamenti: Francesca Miselli, Alessandro Gronchi, Marco Losa, Elena Conca, Silvia Brich, Elena Fumagalli, Marco Fiore, Paolo G. Casali, Marco A. Pierotti, Elena Tamborini, Silvana Pilotti.

COMUNICAZIONI ORALI



O32 LE PROPRIETÀ ONCOSOPPRESSIVE INTRINSECHE DELL'ONCOGENE MET COME STRUMENTO DI MORTE APOPTOTICA DELLE CELLULE TUMORALI

Di Renzo M.F.

Università degli Studi di Torino - IRCC, Candiolo, Torino

Intrinsic tumor suppression pathways are innate and self-defeating programmes that evolution has associated to oncogenes to balance the threatening ones. Intrinsic tumor suppressor activity of the RAS and MYC oncogenes has been widely demonstrated. It has been also sought as a switch useful to turn oncogenic signals into cytotoxic or cytostatic ones. Oncogenic tyrosine kinases (TKs) might harbor intrinsic tumor suppressive functions. They sit at the apex of multiple downstream signaling pathways that exert various biological effects depending upon cell type and context. While some of these pathways are mitogenic and pro-survival, others might restrain the oncogenic potential by promoting, for example, apoptosis and senescence. Obviously, the latter programmes do not confer a selective advantage to neoplastic cells and thus they are hidden in cancer cells. However it is conceivable that intrinsic tumor suppression of TKs might be unleashed by either oncogene inhibition or, paradoxically, by oncogenic activation. We have demonstrated that, in the context of ovarian cancer cells, HGF dependent activation of the MET oncogene results in activation of a cell death programme, which is revealed by the subsequent cell treatment with drugs, and that this program fully relies of p38MAPK activation. This was a novel and surprising finding. HGF elicits a distinctive biological program known as "invasive growth" by orchestrating cell survival, proliferation, and motility through activation of its receptor and of several downstream signaling pathways, such as the extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and the AKT substrate mammalian target of rapamycin. We found, indeed, that the above pathways are activated by HGF in ovarian cancer cells, but they are overcome by the pro-apoptotic activation of p38MAPK. We also demonstrated that this mechanism operates in an array of ovarian cancer cell lines, carrying different genetic abnormalities, such as either PI3K mutation or amplification or AKT amplification and either p53 proficiency or deletion.

As we have shown that in ovarian cancer cell lines HGF dependent sensitization to drugs requires long-term exposure, we hypothesized that HGF pro-apoptotic effect could be coupled to transcriptional regulation of gene transcription and we have studied the transcriptional targets of HGF and cisplatin, alone or in combination, in ovarian cancer cell lines. The identified molecules are sought as regulators of ovarian cancer cell apoptotic death and can be prospectively viewed as targets for therapy. We have identified transcripts modulated in cells committed to death by HGF. Among them, we found L2DTL/CDT2/RAMP, a subunit of the RING-CUL4 complex that confers specificity to the above ubiquitin ligase for the CDT1 (replication licensing factor) and for p21. We also show that silencing of CDT2 impairs survival not only of ovarian cancer but also of other cancer cell lines but not of immortalized normal human cells lines.

Ringraziamenti: this work is funded by AIRC (the Italian Association for Cancer Research) and by the Italian Ministry of Health.

O33 IL PARTENOLIDE SENSIBILIZZA LE CELLULE DI EPATOCARCINOMA ALL'APOPTOSI INDOTTA DA TRAIL

Carlisi D., Emanuele S., Angileri L., D'Anneo A., Ciraolo A., Montalbano R., Vento R. e Tesoriere G.

Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Palermo, Policlinico via del Vespro 129, 90127 Palermo

Introduzione

TRAIL è un membro della superfamiglia "TNF", in grado di indurre morte per apoptosi in cellule tumorali, risultando poco tossico per le cellule normali. Tuttavia, alcune forme tumorali, come il carcinoma epatocellulare, mostrano resistenza all'apoptosi indotta da TRAIL, che può essere prevenuto associando al TRAIL altri composti quali gli inibitori del proteasoma o delle deacetilasi istoniche.

Il partenolide, un sesquiterpene lattone derivato dalla pianta medicinale "*Tanacetum partenium*", è noto per le sue proprietà antiinfiammatorie correlate con l'inibizione di NF-kB. Il partenolide riduce anche la fosforilazione di STAT-3, inibendo così il segnale trasmesso da citochine della famiglia della IL-6. Recentemente è emerso che il partenolide esercita un'azione antiproliferativa e pro-apoptotica in diverse linee tumorali ed inoltre, annulla la resistenza a TRAIL in cellule di cancro alla mammella e mieloma multiplo.

Obiettivo

Questo studio intende accertare se il partenolide è in grado di sensibilizzare le cellule di epatocarcinoma umano all'apoptosi indotta da TRAIL.

Materiali e Metodi

Linee di epatocarcinoma cellulare impiegate: HepG2, Hep3B e SK-Hep1. Composti utilizzati: partenolide (25 mM) e TRAIL ricombinante umano (50 ng/ml). L'apoptosi è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica dopo colorazione con annexinaV/PI. Sono stati condotti esperimenti di western blotting, real-time PCR, trasfezione con siRNA per STAT3.

Risultati e discussione

I nostri studi evidenziano che dosi sub-tossiche di partenolide sensibilizzano le cellule di epatocarcinoma HepG2, Hep3B e SK-Hep1 all'apoptosi indotta da TRAIL e che partenolide e TRAIL interagiscono con meccanismo sinergico. Inoltre, in tutte e tre le linee cellulari l'evento apoptotico, indotto dalla combinazione partenolide/TRAIL, si accompagna ad un notevole aumento dell'espressione dei recettori di morte DR4 e DR5. Questi effetti possono essere correlati con variazioni delle proteine STAT. Infatti, sia il partenolide che l'associazione partenolide-TRAIL riducono i livelli delle forme fosforilate attive di STAT3 e STAT5. Inoltre, il silenziamento di STAT3 potenzia l'effetto del partenolide sui recettori di morte, suggerendo, quindi, che STAT3 può inibire trascrizionalmente DR4 e DR5.

Infine, il trattamento col solo partenolide aumenta i livelli di p53, effetto che potrebbe contribuire all'*up-regulation* dei recettori di morte.

I risultati indicano che il trattamento combinato partenolide/TRAIL induce una rapida attivazione della caspasi-8, seguita dall'attivazione della caspasi-3. Nel meccanismo apoptotico non sembra essere coinvolto il mitocondrio.

L'impiego del partenolide nel sensibilizzare cellule di epatocarcinoma all'apoptosi indotta da TRAIL potrebbe rappresentare una valida strategia terapeutica nel trattamento dei tumori epatici.

COMUNICAZIONI ORALI



O34 IN VITRO AND IN VIVO FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NEW CYCLE-PEPTIDES INHIBITORS FOR C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR-4 (CXCR4)

Portella L.¹, Napolitano M.¹, Consales C.¹, D'Alterio C.¹, Polimero M.¹, Cioffi M.¹, Vitale R.M.^{3,2}, Monfregola L.², Castello G.¹ and Scala S.¹

¹U.O.S.C. Immunologia Oncologica, Istituto Nazionale Tumori Fondazione "G. Pascale" Napoli (Italy). – dott.portella@gmail.com

²Istituto di Biostrutture e Bioimmagini (IBB)- CNR. Napoli (Italy)

³Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR. Comprensorio "A. Olivetti", Pozzuoli (Napoli) – Italy

The C-X-C chemokine receptor-4 (CXCR4) is a receptor for stromal cell-derived factor 1a (SDF-1a/CXCL12) mainly implicated in lymphocytes homing. CXCR4 is also overexpressed in human cancers while SDF-1a is preferentially expressed in organs sites of metastasis. Thus, efficient CXCR4 antagonists could be welcome to inhibit metastatic spreading. Through rationale design a new library (20 units) of cycle-peptide molecules, that consists of 5 and 7 amino-acid residues cyclized by a S-S bridge, was generated based on SDF-1a and v-MIP II analogy. CCRF-CEM, T-leukemia cell lines and PES43, human melanoma cell line, overexpressing CXCR4 were evaluated for the capability of CXCR4 inhibition through the above peptides. Indirect receptor binding and calcium flux were evaluated by flow cytometry, ERK1 and ERK2 phosphorylation, and cell migration were evaluated too. Four cycle-peptides showed a significant inhibitory activity on chemokine-induced receptor's activation. Supported by in vitro results we move to in vivo experiments. Treatment of CXCR4-B16 transduced mice showed inhibition of lung metastases in mice treated with 3 out of 4 peptides as compared to AMD3100. Ongoing experiments are evaluating the tumor growth inhibition by peptides' treatment in xenograft mice s.c. injected with SN12C-pEGFP cells (Human Renal Cell Carcinoma). Thus according to our results cyclized peptides CXCR4 inhibitors could play an important role as therapeutic agents against cancer progression.

O35 NANOPARTICELLE DI ZnO INDUCONO STRESS OSSIDATIVO E APOPTOSI IN CELLULE DI CARCINOMA DEL COLON (LoVo)

B. De Berardis, G. Civitelli, M. Condello, P. Lista, R. Pozzi, G. Arancia, S. Meschini

Dip. Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, Roma, Italia, 00161 Roma

Introduzione

Le nanoparticelle (NP) vengono attualmente utilizzate in numerose applicazioni industriali e biomediche. Nonostante ciò, non sono stati ancora completamente chiariti i loro possibili effetti negativi sull'utilizzatore finale, sul lavoratore impiegato nella produzione e sull'ambiente. La valutazione del rischio relativo all'impiego delle NP è ostacolata dalla mancanza di standard di riferimento per valutarne la citotossicità. Poiché le NP possono essere assunte anche per ingestione e quindi provocare danni all'epitelio intestinale, in questo studio abbiamo valutato gli eventuali effetti citotossici delle nanoparticelle di ossido di zinco (ZnO-NP) su una linea cellulare umana di carcinoma del colon (LoVo).

Metodi

Le colture cellulari sono state trattate con concentrazioni crescenti di ZnO-NP e sono state ricavate le curve di crescita per verificarne l'effetto sulla proliferazione cellulare. Le cellule trattate sono state analizzate mediante microscopia ottica e microscopia elettronica a scansione per rivelare eventuali alterazioni morfologico-ultrastrutturali. La citotossicità è stata valutata mediante il test colorimetrico WST-1 (water-soluble tetrazolium assay). La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), i livelli di glutazione, le modificazioni del potenziale di membrana mitocondriale e l'espressione dei marker apoptotici sono stati quantificati mediante citometria a flusso.

Risultati e discussione

Le preparazioni di ZnO-NP sono state dapprima caratterizzate per le loro proprietà chimico-fisiche e morfologiche utilizzando la microscopia elettronica a scansione e a trasmissione. Le sospensioni di particelle usate per trattare le colture cellulari contenevano essenzialmente singole particelle sferiche di natura cristallina (45-60 nm) ed aggregati di varie dimensioni (100-600 nm). Il trattamento delle cellule LoVo con le ZnO-NP (5 µg/cm² per 24 ore) induceva una notevole diminuzione della vitalità cellulare, un aumento della produzione di H₂O₂/OH[•], una diminuzione della produzione di O₂⁻ e contenuto di glutazione, depolarizzazione delle membrane mitocondriali. Tali alterazioni apparivano essere dose- e tempo-dipendenti. Le analisi microscopiche (Hoechst staining) e citofluorimetriche (Annexin V-FITC and propidium iodide double staining) hanno chiaramente indicato l'induzione del processo apoptotico nelle cellule LoVo in seguito all'interazione con le ZnO-NP.

In conclusione, i risultati di questo studio sembrano dimostrare che le nanoparticelle di ZnO sono fortemente citotossiche per le cellule LoVo inducendo stress ossidativo con conseguente morte cellulare per apoptosi.

COMUNICAZIONI ORALI



O36 DEGRADATION OF P73 BY TWO NOVEL E3 UBIQUITIN LIGASES

Melino G.

*University Tor Vergata, Rome, Italy; Medical Research Council,
Toxicology Unit, Leicester, UK*

p73 steady state protein levels are kept low under normal physiological conditions through degradation by the 26S proteasome, mediated by the HECT-containing E3 ubiquitin ligase Itch. In addition to this major degradation pathway, we described two novel mechanisms of degradation. Firstly, we identified that the orphan F-box protein FBXO45, can target both TAp73 and Δ Np73 isoforms to degradation by poly-ubiquitylation. Moreover, silencing of FBXO45 in human tumour cell lines resulted in p73 stabilization preceded by cell death in a p53-independent manner. FBXO45 is the human ortholog of the *C.elegans* F-box protein FSN-1, therefore this novel finding elucidates a conserved pathway evolved from nematode to human, by which the p53 family members are regulated by an SCF-dependent mechanism. Secondly, we identified and characterized a novel transcriptional target of TAp73 the ring finger domain ubiquitin ligase PIR (p73-induced Ring Finger). Although DNA damaging agents induced PIR expression, its overexpression had no significant direct consequence per se on apoptotic response or cell cycle profile. However, co-expression of PIR with TAp73 or Δ Np73 resulted in the preferential degradation of Δ Np73, hence an increase in the TA/ Δ Np73 ratio. Finally, PIR was able to relieve the inhibitory effect of Δ Np73 on TAp73 induced apoptosis following DNA damage. PIR seems to be the first ubiquitin ligase able to differentiate between the TAp73 and Δ Np73 isoforms. Indeed, in response to DNA damage TAp73 is activated to induce cell cycle arrest or apoptosis, while Δ Np73 is rapidly degraded, highlighting the significance of the relative ratio of each isoform. This differential regulation of TAp73/ Δ Np73 stability may offer a novel therapeutic approach to enhance the chemosensitivity of tumour cells. In conclusion, we describe two novel mechanisms of p73 degradation, by FBXO45 and by PIR.

O37 INGEGNERIA DEI TESSUTI: UNA NUOVA PROSPETTIVA PER LA RIPARAZIONE DEGLI ORGANI?

Di Nardo P.

*Lab. di Cardiologia Molecolare e. Cellulare, Università di Roma
Tor Vergata
Japanese-Italian Tissue Engineering Laboratory, TWIns, Tokyo*

La rigenerazione del tessuto miocardico e' considerata una straordinaria sfida dalla comunità scientifica internazionale, data la complessità di tale tessuto e l'impatto delle patologie cardiache sul benessere della popolazione. Recentemente, l'utilizzo di cellule staminali adulte di derivazione autologa ha suscitato grande interesse, ma i primi tentativi di iniettare cellule progenitrici nel miocardio hanno dato esito incerto. Per questo motivo, approcci terapeutici basati sull'utilizzo di cellule staminali adulte in combinazione con strutture polimeriche biocompatibili appaiono particolarmente promettenti nel trattamento delle patologie cardiache. Esperimenti recenti realizzati dal nostro gruppo hanno indicato che l'adozione di particolari accorgimenti nel disegno degli scaffold polimerici permette non soltanto la corretta adesione delle cellule staminali adulte, ma puo' influenzarne la proliferazione, la vitalità e persino la capacità differenziativa. Per tale motivo, cellule staminali adulte di origine midollare, cardiaca e adipose umane e murine sono state coltivate e indotte al differenziamento su scaffold polimerici sintetici (PLA, PLGA, PCL) la cui struttura tridimensionale e la porosità è stata accuratamente studiata. Infine, un innovativo protocollo per generare foglietti multistratificati di cellule staminali in assenza di scaffold e' stata implementata e testata in vitro ed in vivo, in modelli murini di infarto del miocardio.

O38 BIOMATERIALI IN MEDICINA RIGENERATIVA: INFLUENZA SULL'APOPTOSI

Barbucci R.

Università degli Studi di Siena

COMUNICAZIONI ORALI



O39

ANALISI DEI RISCHI DEL PROCESSO DI PRODUZIONE DI MEDICINALI PER TERAPIA CELLULARE SOMATICA IN UNA STRUTTURA OSPEDALIERA IN ACCORDO CON LE GOOD MANUFACTURING PRACTICE

Bambi F. *, Ceccantini R. *, Giannini P. *, Bisin S. *, Gianassi S. °

*Laboratorio di Terapia Cellulare, Servizio Trasfusionale, Dipartimento di Oncoematologia e Terapie domiciliari °Qualità ed accreditamento – Azienda Ospedaliero Universitaria Meyer

Background

I prodotti per terapia cellulare somatica (PTC) sono a tutti gli effetti "farmaci" innovativi sperimentali che costituiscono importanti alternative terapeutiche nell'ambito della medicina rigenerativa, nel trapianto emopoietico per favorire l'attecchimento e controllare la Graft vs Host Disease (GvHD). Appartengono alla classe dei medicinali per terapie avanzate (ATMP) e consistono in preparazioni a base di cellule vive o parti complesse di esse manipolate in vitro per alterarne alcune caratteristiche biologiche e somministrate a scopo terapeutico ad uso omologo o non omologo. Diversamente dai farmaci convenzionali i PTC sono prodotti in ambiente ospedaliero o in Cell Factory private che devono essere allestite come vere e proprie "officine farmaceutiche", rispettare l'iter di sviluppo e autorizzativo dei farmaci convenzionali, nonché i requisiti di qualità previsti dalle Good Manufacturing Practice (GMP) per la produzione di farmaci sterili. Le GMP stabiliscono che il contenimento della contaminazione ambientale, la convalida dei sistemi critici e lo sviluppo di un sistema di analisi e gestione del rischio (Quality Risk Management) sono principi irrinunciabili per la produzione di farmaci sterili, ovviamente non sterilizzabili, caratterizzati da una inevitabile variabilità biologica e da una farmacocinetica e farmacodinamica non facilmente standardizzabile.

Scopo e obiettivi

Presso il Laboratorio di Terapie Cellulari del Servizio Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Meyer è stato realizzato un processo di analisi dei rischi per individuare e pesare le criticità della produzione di "farmaci" per terapia cellulare somatica, concorrendo alla definizione di un *Validation Master Plan*, sviluppando gli opportuni protocolli di convalida di impianti, attrezzature critiche, processi produttivi e sistemi di controllo qualità.

Materiali e Metodi

E' stata applicata la tecnica HACCP (Hazards Analysis and Critical Control Points) al processo di produzione di cellule mesenchimali midollari (MSC). Sono stati calcolati gli Indici di Rischio (IPR) dei pericoli, dei punti di controllo critici (CCP) e dei parametri critici in base alla severità dell'effetto del pericolo sul prodotto e sul paziente e alla frequenza e rilevanza del parametro che può determinarlo. L'integrazione dei risultati dell'analisi dei rischi con i requisiti GMP è utilizzata per la definizione delle priorità di convalida dei sistemi critici e per la progettazione dei protocolli di qualifica e convalida dei sistemi a maggiore criticità.

Risultati

Sono state individuate 49 attività di processo critiche che potrebbero avere effetti negativi sul prodotto e sul paziente. 31 di queste ($105 \geq \text{IPR} \geq 40$) costituiscono un rischio per la safety microbiologica del prodotto; 17 per la vitalità cellulare ($64 \geq \text{IPR} \geq 16$) e 15 per l'identità morfologica e fenotipica ($48 \geq \text{IPR} \geq 6$). Il rischio di contaminazione è diffuso lungo tutto il processo produttivo, mentre il rischio per l'identità si concentra nella fase di isolamento delle (MSC) dalle altre componenti cellulari del midollo e quello per la vitalità al termine del processo, nella fase di congelamento. Per minimizzare il rischio di contaminazione microbiologica sono state individuate azioni correttive mirate e aggiuntive rispetto ai sistemi di monitoraggio già in essere che hanno impatto sia sull'ambiente che sulle attrezzature che sul personale.

Inoltre sono stati pianificati una serie di test di controllo di qualità sul prodotto intermedio (sterilità, conta cellulare, colorazione sopravvitalità e immunofenotipo) che vanno ad integrare i test di rilascio obbligatori. Il Validation Master Plan redatto sulla base dei risultati dell'analisi dei rischi attribuisce priorità di convalida alle attrezzature del laboratorio controllo Qualità e successivamente alle tecniche analitiche utilizzate. Poiché il rischio di contaminazione in un simile contesto è di particolare rilievo, è stato progettato e realizzato il protocollo di convalida del Test Rapido di Sterilità (EU-PH 2.6.27) con il sistema automatizzato BacT/ALERT 3D che, avendo un tempo di incubazione di 7 giorni, permette la riduzione del periodo di quarantena del prodotto cellulare, il suo rilascio in deroga e l'attuazione di tempestive azioni correttive in caso di test positivo durante la lavorazione. I risultati di sensibilità, specificità e riproducibilità dei test effettuati sono stati congruenti tra loro e con gli standard di performance indicati dalla ditta produttrice. Il tempo medio di incubazione per la rilevazione di positività è stato di 24 ore per i microrganismi aerobi; di 56 ore per la prova di sensibilità, specificità e riproducibilità e 28 ore per la prova di fertilità per i microrganismi anaerobi, mentre per i miceti è stato necessario di un periodo di incubazione maggiore (48 ore per la prova di sensibilità, specificità e riproducibilità e 44 ore per la prova di fertilità).

Discussione

Lo studio ha dimostrato che la tecnica HACCP si è rivelata idonea a migliorare l'efficienza della GMP-facility, destinando risorse umane e tecnologiche solo là dove è necessario, nel momento opportuno e con modalità efficaci, riducendo i costi di un'attività molto onerosa. Inoltre lo studio evidenzia i vantaggi di allestire un Laboratorio Controllo Qualità GMP conforme e autorizzabile dall'ente regolatorio, in quanto migliora l'efficacia e l'efficienza delle fasi di messa a punto del sistema e delle fasi di produzione, contribuendo al miglioramento continuo del prodotto cellulare e alla progettazione e sviluppo di futuri farmaci innovativi.

COMUNICAZIONI ORALI



O40 CELLULE STAMINALI ENDOGENE ED ESOGENE PER CONTRASTARE LA MORTE CELLULARE NELLE DISTROFIE MUSCOLARI

Sampaolesi M.

Sezione di Anatomia Umana, Università degli studi di Pavia

Le distrofie muscolari sono un gruppo di malattie caratterizzate da degenerazione muscolare che compromette la motilità dei pazienti. Spesso anche il tessuto cardiaco risulta compromesso. Nuove strategie per il trattamento di queste malattie sono attualmente in fase di studio ed essenzialmente prevedono l'attivazione e il potenziamento di cellule staminali endogene o il trapianto di cellule staminali esogene. Diversi tipi cellulari sono stati identificati per la loro capacità di riparare il muscolo scheletrico e cardiaco tra cui i mesoangioblasti (Mabs), cellule staminali associate ai vasi. La capacità differenziativa tessuto specifica dei Mabs è stata ben documentata in diversi modelli animali, mentre l'alterazione dell'espressione dei microRNA, (RNA composti da circa 22 nucleotidi e in grado di regolare l'espressione dei geni) evidenziata nei Mabs cardiaci distrofici rivela una complessità biologica di segnali differenziativi ma anche un potenziale target terapeutico per la correzione o il potenziamento di queste cellule. Nella distrofia muscolare e nelle cardiomiopatie l'ipertrofia tissutale è un primo evento di compensazione che poi lascia il campo all'inesorabile degenerazione funzionale del tessuto. Diverse molecole sono coinvolte nell'ipertrofia muscolare tra cui la proteina ricombinante, Magic-F1. La natura del segnale biochimico trasdotto da Magic-F1 spiega le caratteristiche funzionali esclusive della proteina ricombinate, come citochina trofica priva di attività mitogenica ed in grado di contrastare i fenomeni apoptotici nella rigenerazione muscolare. I risultati ottenuti in vitro sono stati confermati dall'analisi in modelli transgenici murini che esprimono la proteina nel muscolo scheletrico. I muscoli dei topi transgenici presentano, infatti, a seguito di un danno muscolare, una diminuzione dei processi apoptotici nel tempo, rispetto al controllo.

In entrambe i casi riportati, proteine ricombinanti e microRNA agiscono in vie di segnale che possono determinare un effetto antiapoptotico e promuovere una corretta rigenerazione del tessuto muscolare.

References

Quattrocelli M et al. Cell therapy strategies and improvements for muscular dystrophy.

Cell Death Differ. 2009 Oct 30. [Epub ahead of print]

Ringraziamenti:

Hanno collaborato: Marco Cassano, Stefania Crippa, Mariana Lo perfido, Mattia Quattrocelli

O41 LE CELLULE STAMINALI EMBRIONALI COME MODELLO PER LO STUDIO DELLE DIFFERENZIATIONE CARDIOMIOCITARIA

Cerbai E.

Centro Interuniversitario di Medicina Molecolare e Biofisica Applicata, C.I.M.M.B.A., Dipartimento di Farmacologia, Università degli Studi di Firenze)

Le cellule staminali embrionali (ES) rappresentano una sorgente cellulare con elevate potenzialità terapeutica per la rigenerazione del tessuto cardiaco danneggiato ed un utile modello per indagare i meccanismi fisiologici di base del differenziamento e maturazione cardiaca. Tale duplice rilevanza delle cellule ES deriva dalla loro comprovata abilità di differenziare verso il fenotipo cardiaco sia *in-vitro* che *in-vivo*. Il processo di differenziamento è guidato dall'attività di una rete di geni responsabili per la specificazione cardiaca e che a loro volta sono regolati in maniera tempo-dipendente da fattori sierici presenti all'interno del mezzo di crescita. Uno di tali fattori è rappresentato dalla serotonina (5-HT), in grado di agire come fattore morfogenetico cardiaco attraverso l'attivazione dei recettori di tipo 5-HT2. Inoltre, evidenze sperimentali suggeriscono che la 5-HT possa avere un ruolo indipendente dall'attivazione recettoriale, in quanto essa è attivamente captata dai cardiomiociti in via di sviluppo e metabolizzata a livello intracellulare. Nel complesso, vie di segnalazione recettoriali e non recettoriali descrivono le proprietà morfogenetiche della 5-HT e confermano ulteriormente l'utilità distintiva delle cellule ES come modello di studio della differenziazione cardiomiocitaria.

O42 MSC ISOLATION AND CHARACTERIZATION IN PATIENTS AFFECTED BY AUTOIMMUNE DISEASES

*Mazzanti B., Ballerini C. *, Aldinucci A. *, Dal Pozzo S., Saccardi R.*

Haematology Department and CBB Florence, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Florence

**Neuroimmunology Department, University of Florence*

Stem cell therapy, traditionally applied to haematopoietic disorders, is now developed for the treatment of other diseases like autoimmune diseases. Over the last decade, haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has been successfully used in the treatment of severe progressive autoimmune diseases like multiple sclerosis (MS) (Saccardi et al., 2006). Other than HSC, bone marrow (BM) contains stromal cells identified as mesenchymal stem cells (MSC).

The potential of MSC to differentiate in several tissue along with their in vitro immunomodulatory capacity and their efficacy in preclinical models, raised the possibility of autologous cell transplantation for the treatment of autoimmune diseases (AD). In addition, BM derived MSC can be rapidly expanded to numbers that are required for clinical applications. In this perspective it seems crucial to study the characteristics of MSC isolated from AD patients prior to a potential clinical application. In particular our data on MSC isolated from Multiple Sclerosis patients will be discussed. MSC obtained from MS patients and healthy donors (HD) were compared in terms of phenotypical and functional characteristics. We show that MSC isolated from MS and HD differ significantly for IP10 production. Therefore, although MSC isolated from MS patients exhibit the same properties of HD MSC in terms of proliferation, phenotype, in vitro differentiation, TLRs expression, immunosuppressive ability, inhibition of DCs differentiation and activation, the use of autologous MSC in cell therapy of autoimmune diseases should be submitted to attentive evaluation.

COMUNICAZIONI ORALI



O43 SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE INDUCES DIFFERENTIATION OF MESOANGIOBLASTS TOWARDS SMOOTH MUSCLE CELLS

Donati C.^{1,2}, Marseglia G.³, Magi A.³, Cencetti F.^{1,2}, Bernacchioni C.^{1,2}, Benelli M.³, Brunelli S.^{4,5}, Torricelli F.³, Cossu G.^{4,6}, Bruni P.^{1,2}

¹Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università di Firenze, 50134 Firenze, ²Istituto Interuniversitario di Miologia (IIM), ³Unità Operativa Citogenetica e Genetica, Azienda Ospedaliera Universitaria, 50134, Firenze, ⁴Stem Cell Research Institute, Istituto Scientifico H San Raffaele, 20132 Milano; ⁵Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Milano-Bicocca, 20052 Monza, Italia; ⁶Dipartimento di Biologia, Università di Milano, 20130 Milano, Italia

Smooth muscle cells (SMCs) control many fundamental functions such as arterial tone, airway resistance, gastrointestinal and genitourinary tract contractility; alterations of vascular smooth muscle cells contribute to a number of major diseases in humans including atherosclerosis, cancer and hypertension. Unlike either skeletal or cardiac muscle cells that are terminally differentiated, SMCs retain remarkable plasticity. A number of relatively recent studies have provided evidence showing that circulating, SMC progenitor cells can contribute to neointima formation and repair following vascular injury [1]. Mesoangioblasts are a new type of stem cells, isolated from explants of dorsal aorta, capable of differentiating into many mesoderm cell types, such as smooth and striated muscle, bone and endothelium. When delivered through the arterial circulation, mesoangioblasts significantly restore skeletal muscle structure and contribute also to the repair of cardiac muscle [2]. The sphingolipid metabolite sphingosine 1-phosphate (S1P) is a lipid mediator that regulates a wide number of fundamental biological processes mainly through the binding to its specific receptors S1PR₁₋₅. Complexity in S1P signalling is increased by the fact that endogenous S1P is mediator of the biological actions of a number of growth factors and cytokines. S1P has recently been shown to have important effects on vascular development and SMC growth and migration, stimulating angiogenesis and inducing vessel maturation in many model systems [3]. We previously demonstrated that S1P acts as potent mitogen and antiapoptotic agent in murine and human mesoangioblasts [4]. Supporting the important role of sphingolipid metabolism, we also recently showed that TGF β exerts a marked antiapoptotic action in mesoangioblasts with a mechanism involving regulation of SphK1 [5]. In order to completely utilize the therapeutic potential of these cells, with the aim of fully individuating the pleiotropic biological action of S1P, we performed a microarray study to establish transcriptional profiles of human mesoangioblasts treated with 1 μ M S1P for 6 h and 24 h. Obtained results, validated by Real time PCR, Western blot and immunofluorescence analysis, demonstrate for the first time that S1P promotes differentiation of human mesoangioblasts towards SMC by enhancing the expression of myogenic marker proteins, such as calponin-1, tropomyosin-1, transgelin, etc. Moreover, we present evidence that TGF β -induced differentiation of mesoangioblasts into SMC relies on SphK regulation, since pharmacological inhibition of the enzyme impaired the ability of the cytokine of increasing the expression levels of myogenic markers. Analogous findings were obtained in murine mesoangioblasts.

This study individuates an important role of S1P in mesoangioblasts which can be exploited to favour vascular regeneration.

[1] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. (2004)

[2] Cossu G, Bianco P. (2003)

[3] Pyne, S., Pyne, N. J. (2000)

[4] Donati, C., Cencetti, F., Nincheri, P., Bernacchioni, C., Brunelli, S., Clementi, E., Cossu, G., Bruni, P. (2007)

[5] Donati C, Cencetti F, De Palma C, Rapizzi E, Brunelli S, Cossu G, Clementi E, Bruni P. (2009)

O44 THE REXINOID 6-OH-11-O-HYDROXYPHENANTRENE INDUCES APOPTOSIS OF HUMAN OSTEOSARCOMA AND MESENCHYMAL STEM CELLS

Dozza B.^a, Papi A.^b, Lucarelli E.^a, Pierini M.^a, Donati D.^a, Orlandi M.^b

^aModulo di Rigenerazione Tissutale Ossea, Via di Barbiano 1/10, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

^bDipartimento di Biologia Evoluzionistica, Via Selmi 3, Università degli Studi di Bologna, Bologna

Introduction and Aim

Rexinoids are known to exert cytotoxic effects against several types of cancer cells. This study was to assess whether the rexinoid 6-OH-11-O-hydroxyphenantrene (IIF) possesses significant cytotoxic effects against osteosarcoma (OS), a malignant bone tumor in children, and mesenchymal stem cells (MSC).

Methods and results

Different human OS cell lines and MSC were exposed to increasing concentration of IIF and retinoic acid (RA) up to 72 hours to test growth inhibition and apoptosis by methylen blue assay and flow cytometry, respectively. Results showed a time- and dose- dependent decrease of OS cells and MSC following IIF treatment. Among the OS cell lines tested, Saos-2 and MG-63 were more sensitive to IIF compared to U2OS. In particular 80 mM IIF induced a decrease of ~50% and ~40% of Saos-2 and MG-63 cells, respectively, compared to time-matched control within 24 hours. 80 mM IIF induced also the growth arrest of MSC. No effect on cell proliferation was detected following RA treatment. In addition, Annexin V and propidium iodide staining showed that IIF treatment led to an increase of OS cells and MSC in the necrotic/late apoptotic and apoptotic fraction.

Treatment with IIF for 24 hours was accompanied by decrease of antiapoptotic protein Bcl2, while simultaneously proapoptotic Bax level increased in all three OS cell lines tested as revealed by Western blot analysis. IIF increased Bax level in a dose-dependent manner also in MSC. Moreover a caspase 9 activation demonstrated a mitochondrial pathway in apoptosis induction of IIF in OS and MSC cells.

Discussion

Collectively, our results demonstrated that IIF by itself is a strong antiproliferative and proapoptotic inducer. In previous works we demonstrated the remarkable antitumoral activity of IIF in different cancer cells; these results confirm that IIF may be an effective compound for anticancer treatment, including osteosarcoma cell lines. In addition IIF could prevent metastases through the mesenchymal cell inhibition.

COMUNICAZIONI ORALI



O45 RIGENERAZIONE DEL TESSUTO OSSEO NELLA PSEUDOARTROSI CONGENITA DELLA TIBIA MEDIANTE L'IMPIEGO DI CELLULE STROMALI MIDOLLARI AUTOLOGHE: STUDIO PRECLINICO

Devescovi V.^a, Baglio S.R.^a, Leonardi E.^a, Donzelli O.^b,
Magnani M.^b, Giunti A.^a, Baldini N.^a, Granchi D.^a

^aLaboratorio di Fisiopatologia Ortopedica e Medicina Rigenerativa, ^bOrtopedia e Traumatologia Pediatrica, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna, Italia

INTRODUZIONE

La pseudoartrosi congenita della tibia (PCT) è una malattia rara, spesso associata a neurofibromatosi di tipo 1 (NF1), caratterizzata da fratture spontanee che non guariscono. I ripetuti fallimenti chirurgici portano spesso all'amputazione. Un approccio di tipo rigenerativo che sfrutti il potenziale osteogenico delle cellule stromali mesenchimali (MSC), potrebbe favorire la riparazione del tessuto osseo.

SCOPO: L'obiettivo è stato quello di studiare *in vitro* la capacità osteogenica delle MSC di soggetti affetti da PCT e valutare se il microambiente in cui i precursori vengono trapiantati può alterarne potenzialmente rigenerativo.

PAZIENTI E METODI

Sono stati reclutati 7 pazienti affetti da NF1 e PCT (PCT_NF1+), 6 con PCT senza NF1 (PCT_NF1-) e 4 pazienti di controllo. Le MSC sono state isolate da midollo osseo raccolto vicino alla lesione pseudoartrosica (P) e dalla cresta iliaca (IC). Il differenziamento osteoblastico è stato indotto in terreno con siero bovino fetale (FBS) o autologo (AUT), acido ascorbico, desametasone, e β -glicerofosfato. Da biopsie ossee ottenute dalla lesione sono state allestite colture di osteoblasti (OB), il cui sovranatante (OB-CM) è stato usato in esperimenti di cocultura. Il potenziale osteogenico delle MSC è stato saggiato misurando la proliferazione, la formazione di colonie, la produzione di fosfatasi alcalina (ALP), la deposizione di noduli minerali, il rilascio di calcio e l'espressione di geni del differenziamento osteoblastico.

RISULTATI e DISCUSSIONE

Le IC-MSCs ottenute da pazienti con PCT risultano più osteogeniche delle P-MSCs, ma meno di quelle del gruppo di controllo. Il difetto è più marcato nei pazienti con NF1 forse a causa dell'alterazione del gene della neurofibromina, proteina con un ruolo essenziale nello sviluppo scheletrico. Il siero AUT inibisce la formazione di noduli minerali e l'espressione di geni della matrice nel gruppo PCT_NF1-. Tuttavia in alcuni casi di NF1 la funzionalità delle P-MSCs è risultata migliore impiegando il siero AUT, suggerendo che fattori di crescita circolanti potrebbero compensare il difetto costituzionale. Infine OB-CM non ostacola il differenziamento delle IC-MSCs, e sia nel gruppo PCT_NF1- che in quello di controllo favorisce l'espressione di geni del differenziamento.

CONCLUSIONI

L'uso di MSC autologhe potrebbe essere uno strumento utile per il trattamento di PCT ricorrenti, aumentando le possibilità di ottenere la rigenerazione ossea. Studi clinici sono necessari per confermare la reale efficacia di un approccio rigenerativo rispetto alla terapia standard.

Ringraziamenti: Il progetto è stato finanziato con fondi dell'Istituto Superiore di Sanità (Programma Italia-USA, Malattie Rare) e dall'Associazione ONLUS 'Io ci sono'.

O46 DEGENERAZIONE DEL DISCO INTERVERTEBRALE: STUDIO DEGLI ASPETTI ISTOLOGICI E MOLECOLARI PER UNA TERAPIA INNOVATIVA

Leonardi E.¹, Ciapetti G.¹, Devescovi V.¹, Granchi D.¹, Baldini N.¹, Greggi T.², Lulli M.³, Di Gesualdo F.³, Capaccioli S.³

¹Laboratorio di Fisiopatologia Ortopedica e Medicina Rigenerativa, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna - ²SSD Chirurgia delle Deformità del Rachide, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna - ³Dipartimento di Patologia and Oncologia Sperimentale, Università di Firenze - Phoenix ONLUS Stem Cell Foundation for Human Life

Introduzione

La degenerazione del disco intervertebrale inizia con l'invecchiamento, può essere accelerata da fattori genetici o ambientali, e si manifesta clinicamente nella quinta decade di vita. Inoltre, è causa frequente di dolore lombare e implica spesso il ricorso a terapie mediche o chirurgiche. A livello biologico, molte cellule del disco muoiono per apoptosi, mentre la matrice discale viene aggredita dalle metalloproteinasi (MMP), la cui attivazione dipende in larga parte dalla plasmina.

Scopi: Caratterizzare il tessuto discale, analizzando le differenze tra anello fibroso e nucleo polposo. Mettere a punto un sistema di coltura *in vitro* per l'espansione di cellule del disco e lo studio di terapie cellulari innovative. Testare l'impiego di un oligonucleotide antisense diretto contro uPAR, per bloccare l'attivazione della plasmina e la conseguente produzione di MMP o l'utilizzo di cellule stromali mesenchimali (MSC) per la rigenerazione di tessuto funzionale.

Metodi

Il tessuto discale è stato raccolto durante interventi di discotomia. L'analisi istologica è stata condotta mediante colorazioni specifiche per la matrice extracellulare, per evidenziare fibre collagene e proteoglicani. Le cellule da biopsia discale sono state isolate ed espanse in coltura e l'espressione di geni del pattern osteo/condrogenico è stata analizzata in real time PCR. MSC sono state isolate da corpo vertebrale e il loro potenziale proliferativo e differenziativo è stato verificato.

Risultati

Istologicamente sono stati riscontrati disorganizzazione della matrice, aumentata componente collagenica e aumentata vascolarizzazione; nessuna correlazione della degenerazione con età e sesso del paziente o capacità proliferativa delle cellule *in vitro* è stata osservata. Anche a livello molecolare si evidenzia una ridotta espressione dei geni del differenziamento condrogenico a favore di un aumento del collagene I nelle cellule del nucleo polposo. Il sistema tridimensionale di coltura in micromassa ha mostrato di poter favorire un'attiva proliferazione cellulare e la sintesi di matrice. Infine è stata confermata la possibilità di espandere *in vitro* anche MSC da corpo vertebrale e differenziarle in senso osteogenico.

Discussione

L'osservazione della struttura del tessuto discale degenerato, la caratterizzazione delle sue cellule e un efficiente sistema di coltura *in vitro* costituiscono la premessa per approfondire lo studio dei meccanismi molecolari alla base del processo di degenerazione del disco e di strategie innovative per terapie biologiche. Ci si propone, da un lato, di ridurre la degenerazione tissutale bloccando le MMP o inibendo l'apoptosi cellulare e, dall'altro, di indurre la rigenerazione tramite l'azione trofica e il potenziale differenziativo delle MSC.



P1 ANTIPROLIFERATIVE AND PROAPOPTOTIC EFFECTS OF NEW REVERSIBLE AND IRREVERSIBLE INHIBITORS OF EGFR ON NON SMALL CELL LUNG CANCER CELL LINES

**Alfieri R.¹, Cavazzoni A.¹, Galetti M.¹, Carmi C.², Lodola A.²,
Mor M.², Petronini P.G.¹**

¹Department of Experimental Medicine, University of Parma

²Pharmaceutical Department, University of Parma

Introduction: Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is an established new target for the treatment of epithelial tumors, including non-small cell lung cancer (NSCLC). Small molecules inhibitors, such as erlotinib and gefitinib, have been proven to be a useful addition to standard therapy in advanced NSCLC. Although these drugs have been effective, the accumulating clinical experience indicates that most patients develop resistances. Therefore, the main challenge in the treatment of NSCLC is the design of a new generation of inhibitors effective in the treatment of tumors become resistant to traditional reversible kinase inhibitors.

Aim: In this study we have investigated the effects of new reversible and irreversible EGFR inhibitors on a panel of NSCLC cell lines showing a wide range of sensitivity to gefitinib.

Results and Discussion: UPR1024 belongs to a new class of EGFR inhibitors, synthesized by our group, characterized by a hydantoin nucleus and a 5-benzylidene substituent. UPR1024 exerted antiproliferative and proapoptotic effects. The growth inhibitory effect was associated with an accumulation of the cells in the S phase of the cell cycle. Moreover, UPR1024 was capable of inducing DNA damage, associated with increased expression of p53, suggesting an additive mechanism of action. Treatment with UPR1024 resulted in an apoptotic cell death with the involvement of both the extrinsic and intrinsic pathways. UPR1024 features chemical properties that confer multiple mechanisms of action and can be considered a novel combi-molecule capable of both blocking EGFR tyrosine kinase activity and inducing DNA damage.

Combining knowledge from the field of cysteine protease inhibitors and EGFR-TK inhibitors, we have designed and synthesized new potentially irreversible EGFR inhibitors covalently binding the cysteine773 residue in the EGFR-TK catalytic site. The activity of a panel of these new potential irreversible inhibitors of EGFR tyrosine kinase activity have been tested on H1975 NSCLC cell line (carrying T790M point mutation which increases the affinity to ATP, causing resistance to reversible inhibitors). The most promising compound, UPR1206 was more effective than gefitinib in suppressing ligand-induced EGFR autophosphorylation and its downstream signaling such as PI3K/AKT/mTOR and MAPK pathways. Similarly, UPR1206 suppressed proliferation in this cell line and induced cell death by apoptosis. Our findings suggest that compounds which possess a new cystein-trap group can inhibit EGFR autophosphorylation and possess irreversible activity proving their role as new anti-EGFR tyrosine kinase inhibitors when gefitinib based therapy failed.

P2 STUDY OF APOPTOTIC DOUBLE STRAND DNA CLEAVAGE: AN ULTRASTRUCTURAL APPROACH

**Battistelli M.², Burattini S.¹, Ferri P.¹, Sestili P.³, Rocchi M.B.¹,
Falcieri E.^{1,4}**

¹Dip. di Scienze dell' Uomo, dell' Ambiente e della Natura e

³Dip. di Scienze Biomolecolari, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"; ²Lab. di Biologia Cellulare e Microscopia Elettronica e ^{1,4}Ist. di Genetica Molecolare, CNR, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna

Introduction.

Apoptosis is characterized by typical morphological changes and biochemical events. A common hallmark of apoptosis is considered DNA cleavage. Apoptotic DNA cleavage initially produces large fragments (50 kbp), followed by the formation of nucleosomal/oligonucleosomal ones. On the other hand, apoptosis without DNA fragmentation, at least the nucleosomal one, has been described (Zamai et al., 1996; Renò et al., 1998).

Materials and Methods.

To study the correlation between the DNA cleavage and the well known chromatin behaviour, we compared DNA gel electrophoresis analysis with the ultrastructural patterns of chromatin fragmentation revealed by the TUNEL technique applied to electron microscopy. Therefore, a modified TUNEL method, utilizing a gold-conjugated anti-digoxigenin antibody (Goping et al., 1999; Lossi et al., 2002), was carried out on UVB- or staurosporine-treated U937 monocytoid cells, in comparison to UVB- or staurosporine-treated Molt-4 T-lymphoid cells.

Results.

Gold particle density in the different domains of apoptotic nuclei was statistically evaluated. Gold labelling was more intense in dense apoptotic chromatin than in the diffuse one. U937 cells, which evidenced *in vitro* oligonucleosomal fragmentation after both treatments, revealed a significantly higher gold particle density, when compared with Molt-4, which did not, even if showing larger DNA fragments *in vitro*. DNA fragment sizes, characterized by gel electrophoresis and by FIGE, appeared closely correlated to gold particle density on apoptotic chromatin domains (Sestili et al., 1996).

Discussion.

TUNEL applied to electron microscopy is an useful tool to highlight mechanisms underlying apoptotic chromatin condensation and DNA cleavage patterns.

Finally, this technique is very useful to study apoptotic process, since it is able to demonstrate not only the presence of DNA fragmentation but also to detect a precise localization of DNA break points within the different chromatin domains (Burattini et al., 2009).



P3 CARATTERIZZAZIONE DELLA CAPACITA' DIFFERENZIATIVA DELLA LINEA CELLULARE MESENCHIMALE MURINA SR-4987

Bonomi A.¹, Sisto F.¹, Coccè V.¹, Cavicchini L.¹, Gribaldo L.², Pessina A.¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica, Microbiologia, Virologia, Università degli Studi, via Pascal 36, Milano

²Molecular Biology & Genomics, IHCP, Joint Research Centre, Ispra (VA)

Abstract

Introduzione

I recenti progressi nell'utilizzo di cellule staminali mesenchimali (MSC) nell'ambito della medicina rigenerativa/riparativa hanno confermato la notevole versatilità di queste cellule e posto nuovi ed interessanti interrogativi circa la loro attività biologica, che può essere ulteriormente indagata e approfondita mediante modelli di MSC stabilizzate *in vitro*. La linea murina SR-4987, stabilizzata nel nostro laboratorio da colture a lungo termine di cellule stromali di midollo osseo, presenta caratteristiche tipiche delle MSC (morfologia, produzione di M-CSF, sensibilità a FGF-b), esprime markers B-linfocitari ed è in grado di produrre sarcomi in animali singenici.

Scopi

Scopo di questa ricerca preliminare è stata la raccolta sistematica dei dati biologici disponibili sulla linea e la verifica di alcuni importanti parametri (cinetica di crescita, capacità differenziativa *in vitro* e sensibilità a farmaci antitumorali e antinfiammatori).

Metodi

Determinazione della Population Doubling Time (PDT) mediante conta al Trypan Blue; valutazione della capacità differenziativa mediante stimolazione *in vitro* con terreni di coltura specifici per la differenziazione osteo-condro-adipogenica (in comparazione a MSC umane da midollo osseo); valutazione dell'effetto anti-proliferativo di farmaci con test MTT.

Risultati

I risultati mostrano che le cellule SR-4987 mantengono solo in parte la loro plasticità, differenziando in senso osteo-condrogenico ma non adipogenico. Di particolare interesse l'osservazione che queste cellule differenziano spontaneamente in osteoblasti, anche coltivate in comuni terreni di coltura. Le SR-4987 sono molto sensibili all'effetto antiproliferativo di 5-FU, Doxorubicina e Camptotecina mentre risultano resistenti a Paclitaxel. L'indice di resistenza a Paclitaxel riferito ai valori di IC50 di altre linee cellulari tumorali (carcinoma HT-29, leucemia MOLT-4 e glioma T98G) è di circa 20 volte.

Discussione

I dati preliminari confermano la peculiarità di questa linea, le cui caratteristiche sembrano indicare che la sua stabilizzazione/trasformazione sia avvenuta ad uno stadio differenziativo nel quale erano espressi sia recettori stromali che di cellule ematiche (supportando l'ipotesi dell'esistenza di un progenitore comune stromale-ematico). Partendo da queste osservazioni, sarà importante studiare più a fondo l'espressione genica di caratteri utili per comprendere sia la biologia di questa linea cellulare che, più in generale, delle MSC.

P4 CHLOROQUINE POTENTIATES APOPTOTIC CELL DEATH INDUCED BY ENZYMATIC SPERMINE METABOLITES ON HUMAN CANCER CELLS

Condello M.¹, Molinari A.¹, Arancia G.¹, Tempera G.², Viceconte N.², Saccoccio S.², Agostinelli E.²

¹Department of Technology and Health, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy

²Department of Biochemical Sciences 'A. Rossi Fanelli', University of Rome 'La Sapienza' and CNR, Biology and Molecular Pathology Institutes, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy

Introduction

Previous results demonstrated that the oxidation products, H₂O₂ and aldehyde, formed from the enzymatic system bovine serum aminoxidase (BSAO) and spermine, induced cytotoxicity on several tumor cell lines, in particular on multidrug resistant (MDR) ones (Agostinelli et al., 2006). Chloroquine (CQ) is a derivative of quinine and has been widely used as an anti-malarial and anti-inflammatory drug since 1950s. Some studies suggested that CQ, in addition to numerous other biological effects, is also able to sensitize cancer cells to a wide spectrum of cytotoxic drugs by inhibiting autophagic cell survival mechanism (Kim et al., 2009).

Aim

On these bases, aim of the present study was to investigate the possible therapeutic efficacy of an innovative combined treatment based on the use of CQ in association with BSAO/spermine. The study has been carried out *in vitro* on two tumor cell lines of different histotype, melanoma M14 and LoVo colon adenocarcinoma and their MDR counterparts.

Methods

Both sensitive wild type (WT) and resistant counterpart of M14 and LoVo cells were cultured, pre-treated with CQ and then treated with BSAO/spermine, at various concentrations and incubation times. Cell survival was evaluated by the cloning efficiency assay. Morphological and ultrastructural changes were analyzed by transmission electron microscopy (TEM) and laser scanning confocal microscopy (LSCM). The expression of the apoptotic markers was evaluated by flow cytometry.

Results and discussion

The treatment with CQ alone (5-50 µM for 6-48 h, at 37°C) induced only a slightly inhibition of cell growth without appreciable signs of cell damage. When tumor cells were pre-treated with subcytotoxic concentration of CQ (5 µM for M14 and 20 µM for LoVo cells) and then incubated with 6 mM spermine in the presence of BSAO, in PBS-1% BSA, for 60 minutes at 37°C, the clonogenic assay showed that CQ was able to sensitize both WT and MDR cells to spermine metabolites. It was observed greater cytotoxicity on cells pre-treated with CQ than on those treated with BSAO/spermine alone. Transmission electron microscopy observations revealed that the treatment with CQ induced the appearance of numerous vacuoles and lysosomal structures inside the cytoplasm. The lysosomotropic property of CQ, confirmed by LSCM observations after acridine orange staining, seems to be the main reason for its sensitizing effect (Agostinelli and Seiler, 2007). Flow cytometric analysis indicated that the enhancement of the cytotoxic effect was accompanied by an increase of the apoptotic cells ratio in both cell lines. Further studies are in progress to verify if CQ is capable of exerting such an action by modulating the autophagic pathway.

The present study shows that CQ is able to potentiate the cytotoxic effect of the enzymatic oxidation products of spermine, and might represent a new and promising approach in anticancer therapy, particularly against MDR cancer cells (Agostinelli and Seiler, 2007).

References

- Agostinelli E. et al. *Biochem Biophys Acta* 1763: 1040-1050 (2006).
Agostinelli E and Seiler N. *Int J Oncol* 31: 473-484 (2007).
Kim et al. *Autophagy* 5: 567-568 (2009).



P5 PROTECTIVE ROLE OF ALDEHYDE DEHYDROGENASE 7A1 (ALDH7A1) IN HYPEROSMOTIC AND OXIDATIVE STRESS

Di Cesare Mannelli L., Cantore M., Ghelardini C., Failli P.

Dept. of Pharmacology - Viale Pieraccini, 6 - University of Florence

Introduction

Osmolalities exceeding the physiological range of 280-300 mosm/kg H₂O have severe consequences as they induce cell shrinkage, oxidative stress, DNA damage, cell cycle delay, and ultimately apoptosis in the absence of protective mechanisms.

Aim: Since at least in the plants aldehyde dehydrogenase 7 (ALDH7) is involved in osmotic stress survival, in this project we have investigated: 1) if ALDH7A1, the human form of this ALDH7, protects mammalian cells from the toxic effect of hyperosmotic stress; 2) the mechanism of this protection.

Methods

The SV-40-transformed Chinese hamster ovarian cells were stably transfected with the mammalian expression vector pCEP4 alone (CHO-Vector) or with the human ALDH7A1 cDNA (CHO-ALDH7A1). Cell viability was measured by methyltetrazolium (MTT) assay, caspase 3 activity was evaluated by fluorescence measure, superoxide anion level and thiobarbituric acid reactive substances by spectrophotometric assays.

Results

In CHO-Vector and naive cells, hyperosmotic stress induced by adding 400 mM NaCl (4 h) to isosmotic culture medium determined 1) cell shrinking; 2) production of superoxide anion; 3) lipid peroxidation; 4) increase of caspase 3 activity and 5) cell death. High expression of ALDH7A1 protected CHO cells from damages induced by hyperosmosis. In particular, ALDH7A1 expression reduced 1) cell shrinking; 2) superoxide anion level and lipid peroxidation by 50%; 4) caspase activity of about 85% and 5) increased cell viability from 40 to 60%. Moreover, cells high expressing ALDH7A1 were less exposed to lipid peroxidation induced by hypoxanthine/xantine oxidase.

Discussion

Our data demonstrate that ALDH7A1 behaves as protector against hyperosmotic stress induced by high concentrations of NaCl in mammalian cells. This protection seems to be dependent on a reduction of oxidative attack due to superoxide anion. Moreover, ALDH7A1 protects cells from the oxidative stress induced independently from hyperosmosis, identifying a new antioxidant pathway in mammalian cells.

P6 L'INIBIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI HIF-1 CON OLIGONUCLEOTIDI ANTISENTO MIGLIORA LA RISPOSTA APOPTOTICA DI CELLULE DI CARCINOMA DEL COLON A 5FU E OXP

Gariboldi M., Ravizza R., Molteni R., Monti E.

Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale – Sezione di Farmacologia, Università dell'Insubria.

I carcinomi coloretali rappresentano la seconda causa di morte fra tutti i tipi di tumore. La loro refrattarietà alla terapia è ascrivibile a diversi fattori, tra cui la presenza di aree ipossiche nella massa tumorale e i meccanismi adattativi che le cellule tumorali attivano in queste condizioni. Strategie terapeutiche in grado di colpire o sfruttare tali meccanismi potrebbero quindi manifestare un effetto antitumorale selettivo e trovare impiego anche sui tumori coloretali. Il grado di ipossia intratumorale è stato correlato positivamente all'espressione del fattore indotto da ipossia-1 (HIF-1), un fattore di trascrizione formato da due subunità, HIF-1 α , regolabile, e HIF-1 β , espressa costitutivamente. La riduzione della pressione parziale di ossigeno nel microambiente cellulare determina una stabilizzazione dei livelli di HIF-1 α , cui fa seguito la sua traslocazione nel nucleo, dove avviene la formazione del dimero HIF-1 α/β che lega le sequenze HRE (*hypoxia response element*) sui promotori dei geni bersaglio, attivandone la trascrizione. I geni target per HIF-1 sono coinvolti nella sopravvivenza e proliferazione cellulare, nella resistenza all'apoptosi, nell'aumento dell'angiogenesi e quindi nella progressione del tumore verso un fenotipo più aggressivo e maligno.

Nel presente studio abbiamo investigato gli effetti della modulazione di HIF-1 sulla risposta di due linee cellulari di adenocarcinoma del colon al 5-fluorouracile (5FU) e all'oxaliplatino (oxPt), in condizioni di ipossia; abbiamo inoltre valutato la possibilità di migliorare la risposta pro-apoptotica ai tre farmaci inibendo HIF-1 α mediante la transfezione delle cellule con uno specifico oligonucleotide antisense.

I risultati ottenuti mostrano che l'incubazione delle cellule in ipossia induce un aumento dei livelli di HIF-1 α , valutato mediante analisi western blot, e dell'attività trascrizionale di HIF-1, valutata mediante analisi citofluorimetrica di cellule HCT116 e H630 transfettate con un vettore plasmidico contenente il gene della GFP posto a valle della sequenza HRE.

L'aumento dell'attività di HIF-1 è associato alla diminuzione della risposta apoptotica delle due linee cellulari al 5FU e oxPt e l'inibizione dell'espressione di HIF-1 a induce un aumento della percentuale di cellule apoptotiche in seguito al trattamento con i due farmaci, in ipossia.

I dati presentati confermano un ruolo causale di HIF-1 nella scarsa risposta apoptotica in ipossia al 5FU e oxPt ed evidenziano come interventi volti a ridurre l'attivazione potrebbero migliorare la risposta dei carcinomi coloretali alla chemioterapia.



P7 PIRAZOLCARBOSSIAMIDI E MORTE CELLULARE: UNA NUOVA ARMA PER LA CHEMIOTERAPIA

Giansanti V.¹, Camboni T.¹, Tillhon M.¹, Parks M.¹, Prosperi E.¹, Santin G.², Piscitelli F.³, La Regina G.³, Silvestri R.³, Scovassi A.S.¹

¹Via abbiategrosso 207, 27100 Pavia, Istituto di Genetica Molecolare CNR, ²P.zza Botta 10, 27 100 Pavia, Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia; ³P.le Aldo Moro 5 00185 Roma, Istituto Pasteur-Fondazione Cenci Bolognetti, Sapienza Università di Roma Italy.

Abstract:

Introduzione e scopo del lavoro.

Numerosi composti avente attività anti-tumorale sono caratterizzati dalla presenza del pirazolo come nucleo centrale. Dopo aver sintetizzato un pannello di pirazolcarbosioidi, ci siamo concentrati sul nuovo composto RS 2780 (N-2-feniletil 1-(4-clorofenil)-3-metil-5-pirrolipirazole-4-carbossiamide) i cui effetti biologici sono stati valutati su cellule umane tumorali e non, allo scopo di valutarne l'eventuale citotossicità e il meccanismo d'azione.

Metodi.

Saggi di proliferazione (LD50) e di citotossicità (MTT), citofluorimetria a flusso, immunocitochimica, western blotting, elettroforesi in campo pulsato e convenzionale su gel d'agarosio. Linee cellulari umane utilizzate: HeLa (carcinoma della cervice uterina), SW613-B3 (coloncarcinoma), FO46 (fibroblasti non tumorali).

Risultati e discussione.

Un trattamento di 24 ore con concentrazioni crescenti di RS 2780 (da 0.1 a 100 μ M) è in grado di inibire la proliferazione cellulare e di ridurre la vitalità. Il nuovo composto è risultato particolarmente attivo anche sulla linea cellulare SW613-B3, notoriamente resistente a molti chemioterapici, mentre non lo è sulla linea di fibroblasti non tumorali FO46. I nostri esperimenti ci hanno dimostrato che RS 2780 interferisce con le proprietà funzionali e strutturali dei mitocondri, portando così all'attivazione della via apoptotica mitocondrio-dipendente. L'induzione del meccanismo apoptotico è stata dimostrata dalla presenza di alcuni marcatori tipici come la condensazione della cromatina, la frammentazione internucleosomica del DNA, la proteolisi della PARP-1 e l'attivazione delle caspasi-3 e -9. In conclusione, i nostri risultati dimostrano per la prima volta le capacità antiproliferative del nuovo composto RS 2780 sulle cellule HeLa e SW613-B3, indicando che esso è in grado di indurre selettivamente la via mitocondriale dell'apoptosi. Per tale motivo, RS 2780 è stato scelto come capostipite per una nuova generazione di composti; alcuni suoi derivati si sono già mostrati più attivi del composto madre su varie linee cellulari tumorali umane.

P8 FUNCTIONAL CONSERVATION BETWEEN THE *C. ELEGANS* MEX-3 PROTEIN AND ITS HUMAN ORTHOLOG A BCL-2 ARE BINDING PROTEIN TINO/MEX-3D IN ONTOGENESIS AND ONCOGENESIS

Loffredo R., Donnini M., Witort E., Granucci I., Palterer B., Capaccioli S. and Lulli M.

Department of Experimental Pathology and Oncology, University of Florence and Phoenix ONLUS Stem Cell Foundation for Human Life

Introduction

Tino is an RNA-binding protein that belongs to the novel, evolutionarily conserved family of hMex-3 proteins involved in RNA metabolism. The functions of Tino/hMex-3, firstly identified in our lab as a post-transcriptional regulator able to bind to the AU-Rich Element (ARE) of *bcl-2* mRNA, are largely unknown. Instead, its *C. elegans* ortholog ceMex-3 is known to be involved in RNA metabolism during nematode oogenesis/embryogenesis, and affects the spatial/temporal expression of the *pal-1* gene. In turn, PAL-1 protein inhibits ceMex-3 expression in the early embryo, thereby specifying the fate of posterior blastomers. Though correlation between ceMex-3 and PAL-1 is definite, PAL-1 can be expressed even in the presence of high levels of ceMex-3. The lack of ceMex-3 and GLD-1, a general translational repressor during oogenesis, induces transdifferentiation of germ cells into neuronal and muscle cells, which leads to the onset of "worm teratomas". Therefore, ceMex-3 and GLD-1 cooperate to maintain totipotency in nematode germ line by modulating common RNAs at the post-transcriptional level and suggests that their altered cooperation could impact on early phases of cell differentiation. The high conservation between the nematode ceMex-3 and the human Tino/hMex-3 suggests that also Tino/hMex-3 could impact on mammalian embryogenesis, cell polarity and cancer.

Aims

Our aims were to disclose further Tino/hMex-3 biological functions, by: 1) identification of bound transcripts and verification of its effect on their fate; 2) exploration of its role in the early phases of mammal embryogenesis; 3) analysis of Tino/hMex-3 knockout in mouse model.

Methods

The Tino target mRNAs were identified by bioinformatic analysis and the effect of recombinant Tino (Tino-his) on steady-state levels of a subset of them was assessed by quantitative RT-PCR. The levels of Tino mRNA or protein on several heterogeneous tissues and cell types of adult and embryo mouse as well of human have been evaluated by *in situ* hybridization or immunohistochemistry analysis, respectively. Results of *in situ* hybridization gave a map of Tino mRNA levels in different tissues of adult (8 weeks) and embryo (8,5 days) mouse, giving fundamental clues to Tino function in development. In particular, the positive detection of Tino in testicles and some areas of embryo, such as somites and brain mesenchymal cells strongly suggests its involvement on spermatogenesis and embryogenesis. Results of immunohistochemistry indicate that Tino is a cytoplasmic protein restricted to cells of mesenchymal origin. Furthermore, although transient transfection of HEK293 cells with pQE-Tino-his did not affect Bcl-2 mRNA levels, it markedly lowered the levels of BCL-2 protein, which suggested Tino could be a translational repressor in analogy to ceMex-3, its ortholog in *C. elegans*.

Discussion

The detection of Tino mRNA and protein in mouse embryo tissues suggests that it could play a pivotal role in early embryogenesis, while its presence in human adult tissues of mesenchymal origin is in keeping with the role of ceMex-3 in muscle development.

Acknowledgements

We are thankful to AIRC, MUR, ECR Firenze, FCR Lucca, Agenzia Spaziale Italiana (ASI).



P9
THE EFFECT OF SENESENCE AND CRYOPRESERVATION ON ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

Martinello T.¹, Bronzini I.¹, Maccatrozzo L.¹, Mollo A.², Mascarello F.¹, Sampaolesi M.³ and Patruno M.¹

¹Department of Experimental Veterinary Sciences, University of Padova, Italy. ²Department of Clinical Veterinary Sciences, University of Padova, Italy. ³Stem Cell Research Institute, University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Belgium.

Canine adipose tissue represents an ideal source of autologous mesenchymal stem cells because of its wide distribution and availability by means of simple surgical procedures. Canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (cA-MSC) have been shown to possess the capacity to differentiate into mesenchymal lineages although their full characterization is still at an early stage. During *in vitro* expansion, stem cells are damaged due to intracellular and extracellular influences becoming replicatively senescent. This fact restricts their proliferation and differentiation efficiency and limits the yield of numbers of cells needed for regenerative therapy.

In this study, we aimed to determine the effect of senescence and cryopreservation on "stemness" and differentiative potential of cA-MSC. The latter cells were serially passaged until reached the maximal life span. Cell growth, morphology, telomerase activity, senescence and apoptotic markers were determined and compared between early and late passages.

In order to avoid negative consequences of senescence we analyzed the effect of cryopreservation on cA-MSC. Each sample was analyzed immediately and after being frozen in liquid nitrogen for 10-12 months. After cryopreservation, cells conserved their fibroblast-like morphology and alkaline phosphatase positivity but showed lower proliferation, evaluated during 40 days, and lower telomerase activity. The cryopreservation did not alter the CD expression since both fresh and frozen cA-MSC expressed CD44, CD90, CD117 and CD140a, but not CD34 and CD45. Moreover, freezing and storing cA-MSC did not change the adipogenic, osteogenic and myogenic differentiative potential, as evidenced by histochemistry, immunofluorescence and PCR expression analysis. Our data demonstrate that cA-MSC may represent, in veterinary medicine, a promising type of progenitors cells in autologous cellular-based therapies even after a long term storage.

P10
SELECTIVE ASCORBATE TOXICITY TO MALIGNANT MESOTHELIOMA

Martinotti S., Ranzato E., Burlando B.

Department of Environment and Life Sciences, DiSAV, University of Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", viale T. Michel 11, 15121 Alessandria, Italy

Introduction

Malignant mesothelioma (MMe) is a lethal tumor arising from the mesothelium of serous cavities. This cancer shows a close relationship with asbestos exposure and its incidence has been increasing in several countries as a result of widespread use of asbestos. The treatment of MMe is extremely problematic and there is an urgent need to find new therapeutic approaches.

Aims

Ascorbate is an essential nutrient to the human diet, but it is also widely used by people as a medicinal product. About 50 years ago, it was hypothesized that ascorbate could be used in cancer therapy. In this study, we explored the possibility of using ascorbate as a chemotherapeutic agent in the treatment of MMe.

Methods

We evaluated the cytotoxicity of ascorbate on different human MMe cell lines by using neutral red uptake, and compared these results with those obtained on normal mesothelial cells. By using confocal imaging of reactive oxygen species production and the cytochrome c superoxide assay, we also tried to disclose the mechanism of ascorbate toxicity and of its possible selectivity towards tumor cells.

Results

Our results showed that ascorbate is more toxic to MMe cells than to normal mesothelial cells, and revealed that ascorbate selective toxicity is due to a redox mechanism involving extracellular H₂O₂ production combined to higher rates of intracellular superoxide production in MMe cells than in mesothelial cells.

Perspectives

Since best results in chemotherapy are generally obtained with combinations of different compounds, we are focusing on the evaluation of the cytotoxic effect of some common chemotherapeutic drugs used in MM therapy such as cis-platin, etoposide, gemcitabine, imatinib and paclitaxel. Effective concentration values of these drugs will be used to evaluate ascorbate-drug interactions through isobologram analysis. This method will allow to point out possible synergistic interactions to be further tested in pre-clinical studies.



P11

IL BLOCCO IN G2/M INDOTTO DAL TASSOLO SENSIBILIZZA LE CELLULE DI EPATOCARCINOMA UMANO HUH7 ALL'APOPTOSI DA TNF α

Minero V.G., De Stefanis D., Sponton L., Costelli P., Bonelli G., Baccino F.M.

Dipartimento di Medicina ed Oncologia Sperimentale, Università di Torino, Italia

Introduzione

Il tassolo (TAX) è un potente agente antiproliferativo che altera l'equilibrio dei microtubuli bloccando il ciclo cellulare in fase G2/M, con conseguente morte per apoptosi attraverso meccanismi diversi. Per questa ragione il TAX viene utilizzato nella terapia oncologica, e alcuni studi condotti su topi nudi portatori di tumori solidi hanno proposto che l'effetto antineoplastico del TAX potrebbe essere rafforzato dall'associazione con la citochina pro-infiammatoria TNF α .

Scopo

Questo studio era volto a valutare se l'apoptosi indotta da TAX aumenti in seguito all'associazione con il TNF α .

Metodi

Le cellule Huh7 sono state trattate con TAX (range: 0,1-5 μ M), Colchicina (5 μ M) e Nocodazolo (0,2 μ g/ml) in presenza o in assenza di TNF α (15 ng/ml) e, dove indicato, pretrattate con diversi inibitori delle caspasi (20 μ M). La distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare è stata analizzata mediante citofluorimetria a flusso. L'espressione di caspasi-3 è stata valutata con western blotting e l'attività delle proteasi tramite saggio enzimatico. L'espressione in membrana del TNF-R1 è stata analizzata con immunofluorescenza.

Risultati

Il trattamento con TAX-TNF α induce alterazioni morfologiche decisamente più marcate del solo TAX. I risultati ottenuti dimostrano che l'inibitore ad ampio spettro delle caspasi (Z-VAD-fmk) e l'inibitore specifico di caspasi-8 (IETD-CHO) proteggono le cellule Huh7 dall'apoptosi indotta da TAX-TNF α . In particolare, la morte è associata ad attivazione delle caspasi-8 e -3. Quest'ultima, tuttavia, non sembra contribuire significativamente all'apoptosi, in quanto il trattamento delle colture con DEVD-CHO non modifica la percentuale di cellule morte. L'immunofluorescenza per il TNF-R1 di membrana ha dimostrato che le cellule bloccate in fase G2/M emettono un segnale molto più intenso rispetto ai controlli.

Conclusioni

Questi risultati dimostrano che il TAX sensibilizza le cellule di epatocarcinoma Huh7 all'azione del TNF α . Questo effetto sembra dovuto al blocco in G2/M indotto dal TAX, e potrebbe essere associato all'aumento dell'espressione in membrana del TNF-R1. L'apoptosi indotta dal trattamento con TAX-TNF α è caspasi-dipendente, anche se non è chiaro quale sia la caspasi effettrice. Il potenziamento dell'apoptosi ottenuto combinando il TAX al TNF α costituisce un risultato promettente, che indirizza lo studio verso una sperimentazione *in vivo* su tumori epatici murini.

P12

RESTORING DRUG-INDUCED APOPTOSIS IN HYPOXIA-TREATED TUMOR CELLS BY MODULATING HIPK2/P53 AND HIF-1 α PATHWAYS

Nardinocchi L.^{1,2}, Puca R.^{1,2}, Sacchi A.¹, D'Orazi G.^{1,2}

¹Department of Experimental Oncology, Molecular Oncogenesis Laboratory, National Cancer Institute Regina Elena, Rome, Italy; ²Department of Oncology and Neurosciences, University "G. d'Annunzio", Chieti, Italy

Introduction

Solid tumors can survive hypoxic condition by using protective mechanisms including the activation of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), a transcription factor involved in cell proliferation, angiogenesis, and chemoresistance. Moreover, hypoxia attenuates the pro-apoptotic response of oncosuppressor p53 to cellular damage and drug treatment. The tumor suppressor homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) by phosphorylating serine 46 (Ser46) and neutralizing MDM2 inhibition is a crucial regulator of p53 pro-apoptotic function. We have recently shown that HIPK2 is also a transcriptional co-repressor of HIF-1 α and that, inhibition of HIF-1 α activity by HIPK2 stimulates drug-induced apoptosis in p53-dependent and-independent ways. Given its central role in the targeting of cells towards apoptosis upon genotoxic stress, all the conditions that lead to HIPK2 deregulation would end in a multifactorial response leading to tumor chemoresistance by strongly affecting p53 transcriptional activity and apoptosis on one hand and HIF-1 activity on the other hand. HIPK2 can be deregulated in tumors by several mechanisms. Recent studies have shown that HIPK2 is degraded via the proteasome pathway by p53-induced MDM2 and by hypoxia-induced proteins.

Aim

The purpose of our investigation was to evaluate whether hypoxia could deregulate the HIPK2-induced p53 dependent apoptotic transcriptional activity in response to drug and therefore contribute to chemoresistance and whether zinc could counteract the HIPK2/p53Ser46 inhibition, in order to provide evidence for the involvement of both HIPK2 and p53 in counteracting hypoxia-induced chemoresistance.

Results

Upon exposure of colon and lung cancer cells to hypoxia, by either low oxygen or cobalt, HIPK2 function was impaired allowing for increased HIF-1 α expression and inhibiting the p53-apoptotic response to drug. Hypoxia induced expression of the p53 target MDM2 that downregulates HIPK2, thus MDM2 inhibition by siRNA restored the HIPK2/p53Ser46 apoptotic response to drug. Surprisingly, zinc supplementation to hypoxia-treated cells increased HIPK2 protein stability and nuclear accumulation, leading to restoration of HIPK2 binding to HIF-1 α promoter, repression of HIF-1 pathway, and activation of the p53 pro-apoptotic response to drug. Combination of zinc and ADR strongly suppressed tumor growth *in vivo* by inhibiting HIF-1 pathway and upregulating p53 apoptotic target genes.

Discussion

We show here for the first time that hypoxia-induced HIPK2 deregulation was counteracted by zinc that restored HIPK2 suppression of HIF-1 pathway and reactivated p53 apoptotic response to drug, underscoring the potential use of zinc supplementation in combination with chemotherapy to address hypoxia and improve tumor treatment.



P13

ACTIVATION OF THE HISTAMINERGIC H₃ RECEPTOR INDUCES PHOSPHORYLATION OF THE AKT/GSK-3B PATHWAY IN CULTURED CORTICAL NEURONS AND PROTECTS AGAINST NEUROTOXIC INSULTS

*Passani M.B., Scartabelli T., Blandina P., Pellegrini-Giampietro D. and Mariottini C.**

Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica, Università di Firenze, Viale Pieraccini 6, 50139 Firenze

**Present address: Dept. of Pharmacology and System Therapeutics, Mount Sinai School of Medicine, One Gustave Levy Place, 10029 New York NY (USA)*

Stimulation of histamine H₃ receptors (H₃R) activates G_{i/o}-proteins that inhibit adenylyl cyclase and triggers several intracellular pathways such as MAPK and phospholipase A₂. In a previous study we showed that H₃R-mediated phosphorylation of Akt at Ser473 occurs in primary cultures of rat cortical neurons¹, but neither the physiological significance of H₃R-induced Akt activation nor the intracellular events associated with Akt phosphorylation were studied. In this report we address these questions. Using Western blot analysis we characterized the H₃R-dependent activation of the Akt/GSK-3b axis in primary rat cortical neurons. We also investigated the ability of the H₃R activation to modulate the activity of antiapoptotic pathways and to prevent neuronal damage in two distinct models of neurotoxicity.

Western blotting experiments showed that H₃R-mediated activation of Akt in cultured rat cortical neurons depends on phosphoinositide-3-kinase and mitogen-activated-protein-kinase (MEK). H₃R activation phosphorylated, hence inactivated, the Akt downstream effector glycogen-synthase kinase-3b (GSK-3b), increased the expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 and protected cultured rat and mouse cortical neurons from neurotoxic, NMDA-mediated insults in a dose-dependent manner. All these effects were inhibited by the H₃R antagonist inverse/agonist thioperamide. Mouse cortical cells expressed H₃R as revealed by immunostaining experiments, and stimulation of H₃R phosphorylated Akt and decreased caspase-3 activity.

In the CNS, the Akt/GSK-3b axis plays a prominent role in several brain functions. Evidence links increased GSK-3b activity with Alzheimer's disease²; in a mouse model of this neurodegenerative disease, downregulation of GSK-3b-conditional-overexpression diminishes neuronal death and cognitive deficits³ and reduced Akt function has been reported in schizophrenic patients⁴.

Hence, we uncovered a yet unexplored neuroprotective action of the H₃R. Our results suggest that H₃R stimulation may have relevance in the treatment of, e.g., ischemia or neurodegenerative diseases such as schizophrenia or Alzheimer's disease.

¹Bongers et al. 2007 J Pharmacol Exp Ther 323, 888–898

²Joje and Johnson 2004 Trends Biochem Sci 29, 95–102

³Engel et al. 2006 J Neurosci 26, 5083–5090

⁴Emamian et al. 2004 Nat Genet 36, 131–137

P14

COINVOLGIMENTO DELLO STRESS DEL RETICOLO E DEL PROCESSO AUTOFAGICO NELL'APOPTOSI INDOTTA DAL CANNABINOIDE SINTETICO WIN IN CELLULE DI EPATOMA UMANO *IN COLTURA*

Pellerito O., Portanova P., Notaro A., Calvaruso G., Giuliano M., Tesoriere G.

Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Palermo, Policlinico, Via del Vespro 129, Palermo

Introduzione

Studi da noi condotti precedentemente hanno dimostrato la capacità del cannabinoide sintetico WIN di indurre apoptosi in cellule di epatocarcinoma umano HepG2 attraverso un meccanismo, dipendente dal fattore trascrizionale PPAR γ , che prevede riduzione dei livelli di alcuni fattori di sopravvivenza e attivazione di fattori pro-apoptotici della famiglia Bcl-2 (*M. Giuliano et al. Biochimie. 2009*). Recentemente è, inoltre, emerso che in cellule di glioma i cannabinoidi possono stimolare l'apoptosi attraverso induzione di stress del reticolo endoplasmatico seguito da autofagia.

Scopo

L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare il coinvolgimento dell'autofagia nel percorso di morte indotto dal WIN in cellule HepG2 e la dipendenza dell'apoptosi da tale evento.

Metodi

I livelli dei fattori coinvolti nella risposta all'ER stress e nel meccanismo autofagico sono stati analizzati mediante Western blotting e RT-PCR. La formazione dei vacuoli autofagici è stata valutata marcando le cellule con il composto autofluorescente monodansylcadaverina (MDC) e successiva osservazione al microscopio a fluorescenza.

Risultati

Il trattamento delle cellule HepG2 con 10 mM WIN determina, già a tempi precoci (8-16 ore), up-regulation di p8 e CHOP, due fattori con attività pro-apoptotica associati alla risposta allo stress del reticolo. Parallelamente, WIN induce la marcata caduta dei livelli di AKT e della sua forma fosforilata attiva. Poiché è noto che l'inibizione di AKT può promuovere l'autofagia causata dalla mancata attivazione di mTORC1 AKT-dipendente, abbiamo investigato la formazione dei vacuoli autofagici. WIN determina in cellule HepG2, dopo 8 ore di trattamento, la comparsa di un elevato numero di vacuoli autofagici, visibili come granuli brillanti dopo colorazione con MDC. Parallelamente si osserva, dopo trattamento, un marcato incremento nei livelli della forma lipidata attiva di LC3 (LC3-II), un marker della formazione dell'autofagosoma. Per confermare la relazione tra induzione dell'ER stress, autofagia e apoptosi WIN-dipendente, sono stati condotti esperimenti di silenziamento genico su CHOP. Tali studi hanno indicato che la down-regulation di CHOP contrasta la riduzione dei livelli di AKT e parallelamente la citotossicità indotta dal WIN.

Conclusioni

I risultati riportati, sebbene preliminari, sembrano indicare che l'autofagia sia parte del meccanismo attraverso il quale WIN induce apoptosi nelle cellule di epatoma.



P15
PARP INHIBITION INCREASES THE DNA DAMAGE AT
TELOMERES INDUCED BY THE G-QUADRUPLEX LIGAND
RHPS4 AND IMPROVES THE THERAPEUTIC EFFICACY OF
IRINOTECAN/RHPS4 COMBINATION ON COLON CANCER
XENOGRAFT

Porru M.¹, Salvati E.¹, Rizzo A.¹, Scarsella M.¹, Tentori L.², Graziani G.², D'Incalci M.³, Stevens M.F.G.⁴, Zupi G.¹, Biroccio A.¹ and Leonetti C.¹

¹Experimental Chemotherapy Laboratory, Regina Elena Cancer Institute and ²Department of Neuroscience, University of Rome "Tor Vergata, Rome, Italy; ³Department of Oncology, Pharmacological Research Institute "Mario Negri", Milan, Italy; ⁴Center for Biomolecular Research Sciences, School of Pharmacy, the University of Nottingham, Nottingham UK

Background and Aim

The G-quadruplex ligand RHPS4 is known to rapidly induce an ATR driven DNA damage response at telomeres, specifically interfering with telomere replication. Poly (ADP-ribosyl)ation is involved in the regulation of many cellular processes including DNA replication and damage repair. In the last years a number of PARP inhibitors were generated and the synergistic effect of some of those in combination with classic chemotherapeutic agents was described. We recently showed that the combination of RHPS4 with camptothecins has a strong synergistic interaction *in vitro* on colon cancer lines and produced a marked antitumor activity on xenografts, which is in agreement with the proposed model in which RHPS4 interferes with telomere replication. Unfortunately, this combination failed to cure animals as no complete remissions were reported. So, based on the key role of PARP in DNA replication and on DNA damage response activation and on the observation that PARP inhibitors sensitize tumor cells to camptothecins, we evaluated a multicomponent strategy based on the addition of the PARP-1 inhibitor GPI 15427 treatment to the previously established camptothecins followed by RHPS4 combination, with the aim to search for a more effective anticancer therapy.

Results and conclusions

We observed that RHPS4 treatment produced a rapid induction of PARP activity and that the ADP ribose polymers induced by RHPS4 are completely localized at telomeres. Furthermore RHPS4 treated cells showed an increased recruitment of the PARP protein at telomeres as an increased number and the intensity of PARP spots colocalized with TRF1 thus providing a strong rationale for the combination between RHPS4 and PARP inhibitors. The RHPS4 treatment rapidly induces the formation of TIFs and the combination with GPI 15427 a huge increase of the number of TIFs in TIF positive cells, thus suggesting a cooperative effect between the two molecules. As a consequence of, the combination with GPI 15427 was able to increase the ability of RHPS4 in inhibiting the number of colonies of HT29 cells compared to the treatment with RHPS4 alone. The *in vivo* experiments demonstrated the high efficacy of the combination of GPI 15427 with Irinotecan and RHPS4 as this treatment produced an impressive inhibition of tumor weight and a marked tumor growth delay. Notably, after the triple combination a complete regression of tumors was observed in most of the mice treated accompanied by a significant increase of overall survival. In conclusion, these data suggest that the targeting of PARP is a promising strategy to improve the response of solid tumors to antitumoral agents.

P16
PLATELET LYSATE-DRIVEN WOUND HEALING:
MECHANISMS OF ACTION

Ranzato E.¹, Martinotti S.¹, Mazzucco L.², Patrone M.¹, Burlando B.¹

¹Department of Environment and Life Sciences, DiSAV, University of Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", viale Teresa Michel 11, 15121 Alessandria, Italy

²Department of Haematology & Blood Transfusion Medicine, Azienda Ospedaliera Nazionale SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo, via Venezia 16, 15121 Alessandria, Italy

Introduction

Wound healing requires a number of interactions among various cells and their mediators, resulting in an overlapping series of events such as coagulation, inflammation, epithelialization, matrix formation and remodelling.

Aims

Underhealing or hyperhealing sores are a significant challenge to public health service, since conventional treatments are poorly effective and the patient's quality of life is impaired. Hence, great interest has been attracted by new-generation therapies providing healing acceleration and reducing wound complications.

Methods

Growth factors are known to promote wound healing, and the delivering of concentrated amounts of growth factors to the wound site can be obtained by the use of platelet derivatives. We have studied the effects of a platelet lysate (PL) obtained from repeated freezing-thawing of platelet-enriched blood samples.

Results

By using *in vitro* scratch wound models of skin, endothelial, and myoblast cells we have shown that PL promotes wound closure by stimulating cell proliferation and motility. By studying the activation of cell signalling, we have found that the mechanism of action of PL involves cell Ca²⁺, MAP kinases and PI3K/Akt pathways, although with different patterns in different cell types. By means of chromatographic separation and mass spectrometry we have distinguished PL fractions that induce strong wound-promoting effects from others that are almost ineffective.

Perspectives

Taken together, our results demonstrate that the mechanism of PL-induced wound healing consists in a complex activation involving different cell types and cellular activities, such as proliferation, locomotion and matrix remodelling. These data provide a scientific basis for the development of more accurate clinical applications of platelet derivatives.

POSTER



P17 HIV AND APOPTOSIS OF CANCER CELLS: THE KILLER'S PROMISES

Ruggiero M., Punzi T., Morucci G., Pacini S.

Dipartimento di Patologia e Oncologia Sperimentali, Viale Morgagni 50, 50134, Firenze

INTRODUCTION

It is estimated that HIV has been in humans for more than 100 years, thus establishing a delicate survival balance (Curr Opin HIV AIDS. 2009; 4: 247-52). In fact, HIV-produced Vpr protein is cytotoxic against a number of different tumor cells, and *in vivo* studies have indicated an anti-cancer effect mediated by Vpr (Curr HIV Res. 2009; 7: 144-52).

OBJECTIVE

To demonstrate that the anti-tumor properties of HIV are responsible for establishing a symbiotic relationship in humans. METHODS. Meta-analysis of studies showing anti-tumor activity mediated by HIV proteins and peptides.

RESULTS

Vpr induces selective killing of rapidly dividing cells (Curr Drug Deliv. 2004; 1: 335-44), and Vpr-mediated apoptosis was observed in all tumor cell lines tested (Cancer Cell Int. 2009; 12: 9:20). *In vivo*, a dramatic example of anti-tumor activity is the Vpr-induced inhibition of melanoma growth and the induction of complete tumor regression coupled with long-term survival of mice in a highly aggressive and metastatic solid tumor model (Mol Ther. 2006;14: 647-55). It is worth noting that free Vpr is detectable in the serum of HIV patients, and *in vitro* studies implicate extracellular forms of Vpr as an effector of cellular responses mediated through its ability to transduce through intact cytoplasmic membranes (DNA Cell Biol. 2002; 21: 679-88). These results suggest that HIV infection could be associated with reduction of the risk of developing neoplasms, provided that the patient does not assume toxic drugs. In fact, HAART increases the risk of developing cancer and its potential oncogenicity is under investigation (Curr HIV/AIDS Rep. 2008 5: 140-9. Curr Opin Oncol. 2008 20: 534-40). DISCUSSION. These data could be interpreted as follows: on one hand, HAART itself might be involved in the development of cancer, in particular lung cancer, and may not have a beneficial effect on either the incidence or outcome of the lung cancer (Curr Opin Oncol. 2008; 20: 529-33). On the other hand, HAART-induced reduction of viremia could decrease HIV-associated anti-tumor activity. Thus, HIV-associated anti-tumor activity could be responsible for its symbiotic relationship with humans that has led to its persistence; anti-tumor activity could also be responsible for the fact that, despite the potential for different divergent viruses to spread, surprisingly few viruses successfully expanded in humans (Curr Opin HIV AIDS. 2009; 4: 247-52).

We thank Professor Henry Bauer for constructive, helpful discussions. This study was supported by grants of the University of Firenze.

P18 APOPTOSIS AND DIFFERENTIATION IN TRANSFORMED ENDOTHELIAL CELLS GM7373

Tanganelli E., Caldini R., Barletta E., Papucci L., Magnelli L. and Chevanne M.

Department of Experimental Pathology and Oncology; University of Florence, Firenze, Italy

Poly(ADP-Ribose) polymerase (PARPs) is a superfamily of at least 18 enzymes that catalyzes poly(ADP-ribose)ation reaction on a variety of proteins, among which PARP itself. Poly(ADP-ribose) is a branched negative-charged polyanion produced by the polymerization of ADP-ribose moieties from NAD⁺ and is covalently but transiently bound to acceptor proteins. PARP-1 is a highly conserved DNA-binding protein, the most abundant member of the PARP family. PARP-1 and -2 are activated by single- or double-strand breaks of DNA and are involved in DNA repair and cell death induction upon DNA damages. For this reason PARPs is considered a sort of "guardian of DNA integrity", and a molecular switch between life and death. On the other hand, poly(ADP-ribose)ation of proteins affects the local chromosome organization and consequently alters many gene expressions, because of the accumulation of negative charges and conformational changes on acceptor proteins, such as transcription factors. Thus, PARPs are implicated in the regulation of proliferation, and differentiation, both important in tumorigenesis. Moreover, PARPs include the centrosomal PARP-3, the vault-particle associated PARP-4 and the telomeric and Golgi tankyrases-1 and -2, that display complex patterns of subcellular localization, extending the biological relevance of poly(ADP-ribose)ation in cell life organization. Recently it was demonstrated that neoplastic cells undergo differentiation *in vitro* in the presence of PARP inhibitors. However, the chromatin-mediated molecular and cellular events involved remain elusive.

In this study we investigated the effect of PARP inhibitor 3-aminobenzamide (3ABA) on a morphological feature of differentiation in transformed endothelial cells GM7373 with particular regard to the programmed cell death. In fact, apoptosis is a general mechanism in angiogenesis, perhaps to eliminate superfluous cells not included in the vascular network. Exposed to 3ABA, the cells displayed a 40% growth inhibition due to apoptosis. At the same time, survival cell population showed enhanced motility and cytoskeleton rearrangement. Cells cultured on Matrigel plus 3ABA, began to organize a capillary network, in a PI3K/Akt pathway activation dependent manner. Moreover, in these experimental conditions, cells displayed NF- κ B nuclear translocation, and significantly increased expression of Cox-2 and iNOS, all index of angiogenic differentiation.

This evidence confirms PARP involvement in tumorigenesis affecting cellular differentiation through apoptosis modulation of a part of the cell populations in the tumor.

Ringraziamenti: This work was supported in part by a grant of Ente Cassa di Risparmio di Firenze and "Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca".



P19
M2 RECEPTOR ACTIVATION AFFECTS CELL PROLIFERATION AND SURVIVAL INDUCING APOPTOSIS IN HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS

*Tata A.M., Ferretti M., **Fabbiano C., Centofante G., **Ruggeri P., **Ponti D., **Pacini L., §Castigli E., §Catacuzzeno L., §Fioretti B., †Ricordy R., #Mancini P. and #Calogero A.*

*Dip. Biol. Cellulare e dello Sviluppo, La Sapienza, University of Rome, Italy; #Dip. Medicina Sperimentale, La Sapienza, University of Rome, *Polo Pontino, Latina, Italy; §Dip. Di Biologia Cellulare e Molecolare, Università di Perugia; †Ist. di Biologia e Patologia Molecolare, CNR, Rome, Italy*

The potential involvement of acetylcholine and muscarinic receptors in different pathologies, among which cancer, emerged in recent years. Muscarinic receptors are expressed in several primary and metastatic tumors and appear involved in their growth and propagation. In the present work we have characterized the effects of muscarinic receptor activation on cell growth and survival in two glioblastoma lines (U251MG and U87MG) and in primary cultures of glioma biopsies. We have demonstrated by RT-PCR and immunocytochemistry that muscarinic receptor subtypes are expressed in glioblastoma cells. ³[H]-thymidine incorporation experiments and FACS analysis have demonstrated that the M2 agonist arecaidine causes a decrease of glioma cell proliferation and the clonogenic ability in U251MG and U87MG lines. In particular arecaidine causes in U87 cell an arrest in G1/S transition, and in G2/M transition in U251 cells. This different modulation appears dependent on arecaidine induced-p53 activation in U87 but not in U251 cells. Analysis of cell survival by trypan blue and Hoechst staining has showed that cell death is significantly enhanced in arecaidine treated cells. Apoptosis induction has been further analysed by ELISA detection of cytoplasmic nucleosomes and by FACS scattered analysis. Similar results have been obtained in primary cultures obtained from 5 glioma biopsies after 50 micromolar arecaidine treatment, independently on p53 and p16 levels or mutations. It is relevant that arecaidine at 50 micromolar concentration didn't affect survival of normal human and mouse astrocytes. Given the relevant role of K⁺ efflux in apoptotic cell death, we have found that arecaidine upregulates the expression and activity of IK channels, and that the selective IK channel inhibitor TRAM-34 prevented the arecaidine-induced apoptotic cell death.

Finally, preliminary analysis of cell migration performed by the wound healing test and by Boyden's chamber has suggested that the arecaidine treatment does not modify cell migration in U251 but, on the contrary, it stimulates in the U87.

In conclusion we demonstrate that M2 receptor can play a relevant role in the inhibition of glioma cell growth and survival and that it may be an interesting tool for development of new strategies for cancer therapy.

This project has been supported by Cofin-Prin 2007

P20
ESTABLISHMENT OF AN INTERLEUKIN-6 INDEPENDENT VARIANT (CMA-03/06) OF THE HUMAN MYELOMA CELL LINE CMA-03: BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION BY A GENOMIC INTEGRATIVE ANALYSIS

Verdelli D., Nobili L., Todoerti K., Mosca L., Fabris S., Leone S., Lambertenghi Delilliers G., Lombardi L., Neri A.

Dipartimento di Scienze Mediche, Centro di Ricerca per lo Studio delle Leucemie, Università di Milano e U.O. Ematologia 1, Fondazione IRCCS Policlinico, Milano, Italy

Background

Interleukin-6 (IL-6) is the most important growth and survival factor for multiple myeloma (MM) cells. The novel CMA-03/06 human myeloma cell line is an IL-6-independent variant of CMA-03/06, previously established in our laboratory.

Aims and methods

To perform a biological and molecular characterization of the new cell line, and to provide insights into the signaling pathways and target genes involved in the growth and survival of CMA-03/06 using an integrative genomic analysis involving both gene expression and genome-wide profiling approaches.

Results

The addition of IL-6 to the culture medium of CMA-03/06 cells or coculture with multipotent mesenchymal stromal cells did not induce an increase in their proliferation. The immunophenotypic analysis revealed that CD45 expression was considerably reduced in CMA-03/06 compared with CMA-03 cells, whereas they were found positive for both chains of IL-6 receptor, almost undetectable in CMA-03 cells. IL-6 was not detected in the supernatants from either CMA-03 or CMA-03/06 cell lines within 48 h using a high sensitivity IL-6 specific ELISA. Nevertheless, Western blot analysis revealed the IL-6 induced activation of STAT3 and STAT1 in both cell lines. Global gene expression profiling analysis of CMA-03/06 compared with CMA-03 cells identified 21 upregulated and 47 downregulated genes, many of which particularly relevant for MM biology, mainly involved in cellular signaling, cell cycle, cell adhesion, cell development, regulation of transcription, immunologic, inflammatory or defense activity, apoptosis. Comparison of genome-wide profiling analysis of CMA-03/06 and CMA-03 cells evidenced a different copy number in only 15 small chromosomal regions. None of the genes differentially expressed in CMA-03/06 compared with CMA-03 except one were positioned on these regions. Finally, CMA-03/06 cell line showed a lower susceptibility to camptothecin-induced apoptosis compared to CMA-03 cells.

Conclusions

Our data confirm the IL-6 independence of CMA-03/06 cell line and the absence of an autocrine IL-6 loop, even though the cells maintain the IL-6 signaling pathway responsiveness. Furthermore, CMA-03/06 cell line shows an increased resistance to apoptosis in comparison with CMA-03 cells. The novel CMA03/06 cell line may thus represent a suitable model for studies investigating molecular mechanisms involved in clonal evolution towards IL-6 and/or stroma-independent growth and survival of myeloma cells.



P21
COENZYME Q₁₀ INHIBITS APOPTOSIS IN EXPERIMENTAL MODELS OF RETINAL DAMAGE BY PREVENTING OPENING OF MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE

Witort E.¹, Papucci L.¹, Lulli M.¹, Donnini M., Loffredo R., Di Gesualdo F.¹, Piccini M., Carella G.², Blasi M.A.³ and Capaccioli S.^{1,4}

Department of Experimental Pathology and Oncology, University of Florence; ¹Department of Ophthalmology, University-Hospital San Raffaele, Milano ²; Department of Ophthalmology, Catholic University of Rome³; Phoenix ONLUS Stem Cell Foundation for Human Life⁴

Introduction

Apoptotic cell death is one of the main responses of the ophthalmologic districts to environmental damaging agents. Besides those present on earth, they include space irradiations and microgravity, to which astronauts will be subjected during the interplanetary flights programmed by international agencies such as ESA, ASI and NASA, in the next future. More importantly, excessive apoptotic cell death is one of the key pathogenetic events of the two more diffused and severe retinal degenerative diseases, which are glaucoma and age related macular degeneration. We have previously demonstrated that Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) prevented apoptosis of corneal keratocytes both *in vitro* and *in vivo* in response to excimer laser irradiation with a higher efficiency in respect to other antioxidants. Subsequently, our results were directly translated to pharmacology and produced a para-pharmacological drug in form of eye drops. Using a corneal keratocyte cell line as experimental model, we have then demonstrated that the ability of CoQ₁₀ in preventing apoptosis is independent of its free radical scavenging ability being also consequent to its property to inhibit mitochondrial permeability transition pore (PTP), which is the main trigger of apoptotic machinery.

Aims

Aims of this study were to evaluate possible anti-apoptotic property of CoQ₁₀ on cultured retinal pigmented epithelium (RPE) and retinal ganglion cells (RGCs) as inhibitor of mPTP opening, as well as its ability, if administered to cornea as eye drops, to reach retina and to prevent retinal cell apoptosis also *in vivo*.

Methods

Apoptotic stimuli were UVB (15mJ/m²) irradiation for *in vitro* treatments, UVC (2 J/m²) irradiations for *in vivo* treatments, or γ -irradiations (³H-thymidine, 20 μ Ci/ml), glutamate (50 μ M) and respiratory chain inhibitor Antimycin A (200 μ M). The anti-apoptotic activity of CoQ₁₀ (10 μ M) dissolved in Lutrol was evaluated by Time-lapse video microscopy, phase contrast and confocal microscopy and WB analysis of cytosolic cytochrome c. Its ability to reach retina when administered to cornea as eye-drops was confirmed by HPLC analysis of rabbit's retinal specimens.

Results

CoQ₁₀ was shown to be highly effective in reduction of retinal cell apoptosis induced both by free radical generating (UVB, 3H-thymidine irradiation) and by non free radical generating (serum starvation, Antimycin A) stimuli. The eye drops containing CoQ₁₀ administered to cornea reached the choroid-retina district in time- and dose dependent manner.

Discussion

The possibility that the topical administration of CoQ₁₀ could countermeasure retinal lesions induced by environmental and space-related damaging agents by reducing apoptotic death of photoreceptor and ganglion cells is quite feasible. Furthermore, CoQ₁₀ administered to cornea as eye drops could be evaluated as candidate drug to treat severe apoptosis excess-related retinopathies, including glaucoma and age-related macular degeneration

Acknowledgements

We are thankful to ECR Firenze, FCR Lucca, Agenzia Spaziale Italiana (ASI).

P22
INTERFERONE-BETA E TROGLITAZONE: UNA NUOVA STRATEGIA TERAPEUTICA PER L'ADENOCARCINOMA PANCREATICO BASATA SULL'INDUZIONE DELL'AUTOFAGIA

Zappavigna S¹, Vitale G², Marra M¹, Dicitore A², Hofland L³, Giuberti G¹, Misso G¹, Lombardi A¹, Arancia G⁴, Meschini S⁴, Meo G¹, Abbruzzese A¹, Caraglia M¹

¹Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli, Italia; ²Dipartimento di Endocrinologia, Università di Milano, Istituto Auxologico Italiano IRCCS, Milano, Italia; ³Department of Internal Medicine, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands; ⁴Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

L'adenocarcinoma pancreatico rappresenta, ad oggi, la quarta causa di morte nel mondo occidentale per le caratteristiche di aggressività e resistenza alla chemioterapia convenzionale. Pertanto, nuove strategie terapeutiche sono richieste.

Abbiamo studiato la possibile interazione tra l'interferone-beta (IFN β) e il troglitazone (TGZ), agonista di PPAR-g, nelle cellule di adenocarcinoma pancreatico BxPC3.

Abbiamo osservato un forte sinergismo tra IFN β e TGZ nell'indurre inibizione proliferativa quando sono usati a concentrazioni equitossiche (CI₅₀ 0,6). Abbiamo, quindi, studiato gli effetti della combinazione di farmaci risultata sinergica sulla fosforilazione delle proteine STAT1 e STAT3, bersaglio dell'IFN β . L'IFN β da solo induce un aumento della fosforilazione di STAT3 già dopo 6 h di trattamento, che risulta antagonizzato dalla combinazione; la fosforilazione di STAT1, in seguito al trattamento combinato, aumenta in modo paragonabile a quella indotta dall'IFN β da solo. Inoltre, abbiamo studiato gli effetti della combinazione sui pathway di proliferazione e sopravvivenza cellulare. Abbiamo osservato una riduzione della fosforilazione di Erk1/2 e di Akt dopo 6h e 24h di trattamento combinato, rispettivamente mentre l'IFN β da solo ma non il TGZ aumenta sia l'attività di Erk1/2 che di Akt. Inoltre, il saggio EMSA dimostrava che l'IFN β riduce il legame di PPAR-g al DNA mentre il TGZ da solo aumenta di 3 volte l'attività trascrizionale di PPARg, che risulta potenziata (4,5 volte) dalla combinazione. L'analisi del ciclo cellulare al FACS con ioduro di propidio mostrava un blocco nella transizione delle cellule dalla fase G1 alla fase S, che correla con l'aumentata espressione delle proteine p21 e p27, più evidente dopo 24h di trattamento combinato. La combinazione IFN β /TGZ non era in grado di indurre apoptosi; su queste basi, abbiamo rivolto la nostra attenzione ad un meccanismo alternativo di morte cellulare, l'autofagia. Abbiamo osservato una notevole riduzione del complesso beclina1-bcl2 che suggerisce l'attivazione dell'autofagia beclina1-dipendente in cellule trattate con la combinazione, dato confermato dall'analisi al microscopio elettronico a trasmissione che mostra un significativo aumento della formazione di autofagosomi indotto dalla combinazione. Abbiamo, quindi, rivolto la nostra attenzione alla via mTOR-dipendente ed in particolare a due molecole chiave di tale via, 4EBP1 e eIF4E. Abbiamo osservato una riduzione della fosforilazione di 4EBP1 già dopo 6h di trattamento con la combinazione ed ancora più evidente dopo 24h, mentre la fosforilazione di eIF4E risulta ridotta a tempi più precoci (3h) per poi riprendere a 24h.

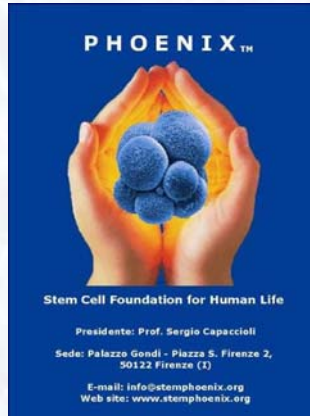
In conclusione, questi risultati rappresentano la prima dimostrazione del sinergismo esistente tra IFN-b e PPAR-g agonisti nell'indurre autofagia nell'adenocarcinoma pancreatico e potrebbero rappresentare il razionale molecolare per gli studi *in vivo*.

Ringraziamenti: Ringrazio di cuore il Dott. Michele Caraglia, la D.ssa Monica Marra e il Prof. Abbruzzese per il supporto scientifico e morale, il Prof. Hofland, il Dott. Giovanni Vitale e il Dott. Giuseppe Arancia per la gentile collaborazione.

SPONSOR



Si ringraziano per il loro contributo i Soci Sostenitori di AICC e di PHOENIX, nonché:



ARETA
BECTON DICKINSON
BIOSPA
EPPENDORF
GIARDINI
INVITROGEN
ITALFARMACO

LEICA
MICROSYSTEMS
LONZA
MASCIA BRUNELLI
PRODOTTI GIANNI
PROMEGA
ROCHE
DIAGNOSTICS
SIAD HEALTHCARE

SIAL
SIGMA ALDRICH
SOCIETÀ PRODOTTI
ANTIBIOTICI
TEBU BIO
TEMA RICERCA
ZEISS

